

Ein Beitrag zur Ermittlung der Primärstruktur des Human-Hämoglobins A

Die Isolierung sämtlicher tryptischer
Peptide aus der α - und β -Kette

Kurt Hilse

1961



Digitized by the Internet Archive
in 2026

EIN BEITRAG ZUR ERMITTLUNG DER
PRIMÄRSTRUKTUR DES HUMAN-HÄMOGLOBINS A.

Die Isolierung sämtlicher tryptischer Peptide
aus der α - und β -Kette.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Kurt Hilse
aus Waldenburg
1961



Berichterstatter: Prof. Dr. A. Butenandt

Tag der mündlichen Prüfung: 10. 5. 61

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. A. Butenandt in der Zeit von April 1959 bis September 1960 durchgeführt.

Herrn Professor Dr. A. Butenandt danke ich für die grosszügige Förderung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. G. Braunitzer bin ich für seine stets hilfsbereiten wertvollen Anregungen zu besonderem Dank verpflichtet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Allgemeiner Teil	
A. <u>Gewinnung der Globinketten</u>	3
1. Die Trennung	3
2. Die Zuordnung	4
3. Die Reinigung	5
4. Das Resultat	7
B. <u>Die löslichen tryptischen Peptide</u>	9
1. Die Darstellung	9
2. Die Fraktionierung	10
3. Die Analysen	14
4. Kritik	22
C. <u>Die fällbaren tryptischen Peptide</u>	23
1. Das unlösliche α -Kettenpeptid HT α 14	24
2. Die unlöslichen β -Kettenpeptide HT β 13 u. HT β 14	25
3. Kritik	27
D. <u>Schlussbetrachtung</u>	27
Zusammenfassung	28
Experimenteller Teil	
A. Versuche zur Gewinnung reiner Peptidketten	29
B. Versuche zur Fraktionierung von Peptiden	31
C. Allgemeine Untersuchungsmethoden	34
Literaturverzeichnis	39

EINLEITUNG

Die biologische Bedeutung der Proteine ist von grosser Vielseitigkeit. Während manche Eiweissmoleküle mechanische Funktionen des lebenden Organismus (z.B. Kollagen) zu erfüllen haben, besteht die Aufgabe sehr vieler Proteine - der Fermente - in einer eng begrenzten chemischen Teilfunktion des Stoffwechsels. Über den Wirkungsmechanismus eines fermentativen Vorganges ist verhältnismässig wenig bekannt, doch hängt er in jedem Falle von der chemischen Struktur des Fermentes ab. Die primäre Struktur eines Eiweisstoffes wiederum wird von den genetischen Faktoren der lebenden Zelle bestimmt. Danach sind die enzymatischen Proteine Vermittler bei der Übertragung der Information des genetischen Materials auf den Organismus.

Die Kenntnis der Struktur der Proteine wird einerseits unser Verständnis der enzymatischen Biochemie wesentlich vertiefen, andererseits die Erschliessung des "Code" zur Ribo- bzw. Desoxyribonucleinsäure erleichtern. Wegen der Grösse und Komplexität des Proteinmoleküls stellten sich Erfolge auf dem Gebiet der Strukturermittlung zunächst nur langsam ein. In den vergangenen 10 Jahren jedoch wurden grosse Fortschritte erzielt. F. SANGER et al. ¹ teilten 1953 die vollständige Formel des Insulins mit 51 Aminosäureresten mit, ² und 1957 wurde bereits die Struktur der Ribonuclease ² mit 124 Bausteinen bekanntgegeben.

Seit der Entdeckung des ersten abnormalen Human-Hämoglobins erhielten die Untersuchungen über Hämoglobine besondere Impulse. Zum ersten Mal wurde gefunden, dass ein pathologischer Zustand an den Aufbau eines bestimmten Moleküls gebunden ist.

Sowohl die Hämoglobine der verschiedensten Spezies, als auch die des erwachsenen Menschen unterscheiden sich in ihren physikalischen Eigenschaften nur geringfügig. Sie besitzen ein Molekulargewicht von 66 800 ³; der isoelektrische Punkt aller roten Blutfarbstoffe befindet sich bei pH 7,0. Daraus kann geschlossen werden, dass in allen Hämoglobinen ein gemeinsames Bauprinzip vorliegt. PERUTZ ⁴ u. a. versuchten die Struktur des Pferde-Hämoglobins physikalisch zu erschliessen. Mit chemischen Methoden wurde die Konstitutionsaufklärung der Human-Globinkomponente von BRAUNITZER und Mitarbeitern am Max-Planck-Institut für Biochemie begonnen.

Durch den Nachweis der beiden N-terminalen Sequenzen 2(DNP-Val-Leu-; DNP-Val-X-Leu-) ⁵ kann angenommen werden, dass der rote Blutfarbstoff aus zwei identischen Untereinheiten aufgebaut ist. Dieser Befund wurde durch die physikalischen Ergebnisse bestätigt. Das kleinste chemische Molekulargewicht ist mithin 33 400. Ferner zeigt das Experiment, dass die Globinuntereinheit aus zwei Polypeptidketten besteht. Jede Kette hat ein Molekulargewicht von 16 500. Die beiden Komponenten (α - und β -Kette) werden durch Wasserstoffbrücken und

Salzbindungen, nicht jedoch durch kovalente Bindungen zu einer Globinuntereinheit verknüpft.

Vor der Ermittlung der Konstitutionsformel wurden methodische Studien angestellt.

Zunächst galt es, die Eiweisskomponente in eine diskrete Anzahl von Spaltprodukten zu zerkleinern. Zur Hydrolyse wurde Trypsin benutzt. Dieses Ferment besitzt eine grosse Spezifität, so dass die enzymatische Spaltung reproduzierbare Spaltprodukte liefert. Die Spaltungsbedingungen ergeben nahezu quantitative Ausbeuten.

Für die Auftrennung des tryptischen Hydrolysates wurden mehrere Methoden versucht. In der Diplomarbeit⁶ wurde das von MOORE, STEIN u. a. entwickelte Verfahren der Kationenaustauschchromatographie in modifizierter Form angewendet. Die Methoden trennen stets nur einen Teil des tryptischen Peptidgemisches in seine Bestandteile. Die Fraktionierung sämtlicher Peptide - zur Konstitutionsermittlung eine unumgängliche Notwendigkeit - konnte RUDLOFF⁷ mit einem Anionenaustauschverfahren durchführen. Damit wurden mit verhältnismässig geringem Aufwand in guter Ausbeute präparative Mengen an Peptiden gewonnen. Hierdurch wurde eine der wesentlichsten Voraussetzungen zu einer systematischen Konstitutionsermittlung des Human-Globins gegeben.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der präparativen Trennung und Reinigung der beiden Polypeptidketten des Human-Hämoglobins A. Im zweiten Teil der Arbeit werden die tryptischen, isoelektrisch löslichen Peptide von beiden Ketten gewonnen, fraktioniert und gereinigt. Der isoelektrisch fällbare Anteil wird ebenfalls untersucht. Als Kriterium für die Reinheit der Peptide dienen die quantitativen Aminosäureanalysen. Es werden 142 Aminosäurereste für die α -Kette und 150 Bausteine für die β -Kette ermittelt.

Durch die vollständige, quantitative Erfassung sämtlicher tryptischer Spaltprodukte, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wird, ist ein wichtiger Befund zur Ermittlung der vollständigen Struktur des Makromoleküls erzielt worden. Es ist nun möglich, die Zuordnung der Spaltprodukte und die Sequenzanalyse vorzunehmen.

Allgemeiner Teil

A. Gewinnung der Globinketten.

1.) Die Trennung.

Für die erfolgreiche Strukturermittlung eines Proteins mit zwei unterschiedlichen Molekülhälften, die durch keinerlei kovalente Bindungen verknüpft sind, ist eine Isolierung der Halbmoleküle notwendig. WILSON und SMITH berichten über die gelungene Trennung der beiden Pferde-Globinketten⁸, die - analog den Human-Globinketten - durch interpeptidale Wasserstoffbrücken und Salzbindungen zusammengehalten werden.

Die Isolierung der Human-Globinketten gelingt unter Verwendung gleicher Versuchsbedingungen nur mangelhaft.

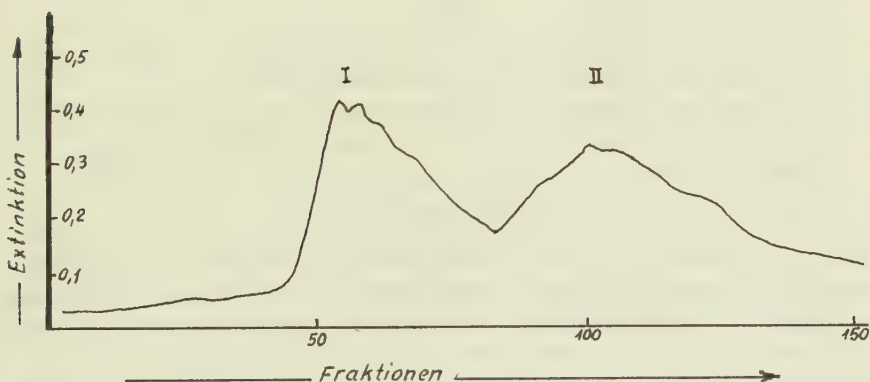


Abb. 1 Säulenchromatographische Analyse der Human-Globinketten mit IRC-50, 200-400 mesh.

Versuchsbedingungen:

Säulengröße: 62 x 2,2 cm; Globinmenge: 700 mg

Elutionslösung: 2m Harnstoff pH 1,9 (1 l);

Gradient: 2m Harnstoff pH 1,9 (2 l) + 8m Harnstoff pH 1,9;

Elutionsgeschwindigkeit: 120 ml/h; Versuchstemp.: 20° C;

Ausgezogene Kurve: UV-Adsorption der Fraktionen b. 280 mμ.

Offensichtlich besitzen die beiden Human-Globinkomponenten in Bezug auf ihre Aminosäurezusammensetzung eine grössere Ähnlichkeit als die des Pferde-Globins.

Durch Änderung der Versuchsbedingungen wurde eine bessere Trennung erreicht (Abb. 2).

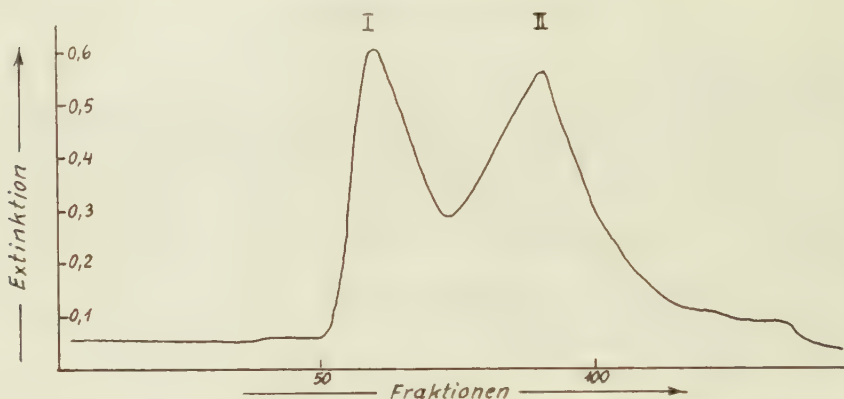


Abb. 2 Säulenchromatographische Analyse der Human-Globinketten mit IRC-50, 200-400 mesh.

Versuchsbedingungen:

Säulengröße: 62 x 1,9 cm; Globinmenge: 420 mg.

Elutionslösung: 2m Harnstoff m. 20% Eisessig pH 1,9;

Gradient: 2m Harnstoff m. 20% Eisessig pH 1,9 +

8m Harnstoff m. 20% Eisessig pH 1,9; Temp.: 20° C;

Elutionsgeschwindigkeit: 30 ml/h.

Ausgezogene Kurve: UV-Adsorption bei 280 m μ .

Die bessere Auftrennung der Ketten gelingt durch Verringerung der Elutionsgeschwindigkeit um das Vierfache⁹. Ferner wurde durch Zusatz von 20% Eisessig zur Elutionsflüssigkeit die verhältnismässig grosse Adsorption des Materials am Harz - ersichtlich an den breiten Gipfeln in Abb. 1 - herabgesetzt.

Auch die verbesserte Methodik liefert noch eine unvollständige Trennung; das Minimum zwischen den beiden Komponenten liegt weit über dem Blindwert.

2.) Die Kettenzuordnung.

Um zu entscheiden, welche der getrennten Komponenten (I) und (II) den beiden Globinketten mit den N-terminalen Endgruppen (Val-Leu-... bzw. Val-His-Leu-...) entsprechen, werden Endgruppenbestimmungen durchgeführt. Dabei wurde bei der Umsetzung der Komponente (II) mit Carboxypeptidase die bereits bekannte C-terminale Endgruppe Histidin erhalten. Bei der Komponente (I) fiel der Versuch negativ aus. Die Bestimmung der N-terminalen Sequenz ergibt bei der Komponente (II) DNP-Val-His-Leu.

Mithin entspricht die Komponente (I) nach der Bezeichnung von RHINESMITH, SCHROEDER u.a.¹⁰ der α -Kette, die Komponente (II) der β -Kette.

3. Die Reinigung.

Die grosse Ähnlichkeit der beiden Globinketten zwingt zur Annahme, dass in ihnen gewisse Teilbereiche nahe verwandt sind. Demnach sind bei den tryptischen Peptiden sehr nahe verwandte Bruchstücke zu erwarten. Eine gegenseitige Verunreinigung der Ketten erschwert die Reinigung der tryptischen Peptide, so dass es bei der quantitativen Aminosäureanalyse der Spaltprodukte von vornherein fraglich erscheint, ob ganzzahlige Vielfache der Aminosäuren erhalten werden und ob eine genaue Ermittlung sämtlicher Bausteine möglich sein wird. Wegen dieses wichtigen Gesichtspunktes muss die Säuberung der von einander isolierten Ketten äusserst sorgfältig erfolgen.

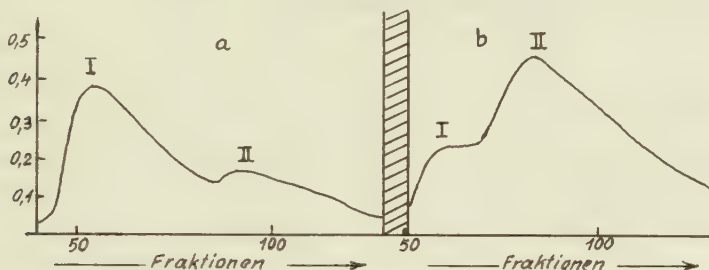


Abb. 3 a Rechromatographie der α -Kette; b. Rechromatographie der β -Kette.

Versuchsbedingungen: siehe Abb. 2

Durch die Rechromatographie der beiden Komponenten (I) und (II) wurde eine gewisse Reinigung (Abb. 3) erzielt. Es fällt aber auf, dass sich die Verunreinigungen nur zögernd von der Hauptkomponente ablösen. Ein Versuch mit einer längeren (150 cm) Chromatographiesäule führte zu dem gleichen Ergebnis.

Zur Feststellung der Einheitlichkeit des gereinigten Materials wurden die tryptischen Peptide der α - und β -Kette mit dem "Fingerprintverfahren" nach INGRAM¹¹ aufgetrennt. Es besteht in einer Kombination von Hochspannungselektrophorese und Chromatographie auf Filterpapier. Sowohl die fraktionierten Peptide der α - als auch der β -Komponente zeigen beim Besprühen des Chromatogrammes mit Ninhydrinlösung eine beträchtliche Anzahl schwächer gefärbter Verunreinigungen. Beim Entwickeln des "Fingerprints" mit dem arginyl-spezifischen Sakaguchi-Reagens reagieren bei den tryptischen β -Kettenpeptiden zwei Flecken schwächer positiv als die übrigen. Einen noch überzeugenderen Hinweis auf das Vorhandensein von gegenseitiger Verunreinigung wird durch die quantitative Untersuchung der tryptischen Peptide nach ihrer säulenchromatographischen Fraktionierung erbracht. Ein arginyl-haltiges Spaltprodukt der α -Kette wurde auch bei den tryptischen Peptiden

der β -Kette gefunden. Die Rechromatographie der Peptidketten mit einer Säule aus IRC-50 ist demnach für eine Säuberung unzureichend.

Von CRAIG et. al. wurde gefunden, dass die Verschiedenheit der Verteilungskoeffizienten beider Globinketten im binären System Butanol(2)/Dichloressigsäure gross genug ist, um eine gute Trennung im Gegenstromverfahren mit 80 Verteilungsschritten durchzuführen^{1,2}. Diese Methode wurde zur Säuberung der säulenchromatographisch getrennten Ketten angewendet. Für eine erfolgreiche Reinigung konnte die Substanzmenge aus 8 Trennungsversuchen mit der IRC-50 Säule (1-1,5g) eingesetzt werden. In den Abbildungen 4 und 5 sind die Gegenstromverteilungsdiagramme von der α - bzw. β -Kette wiedergegeben.

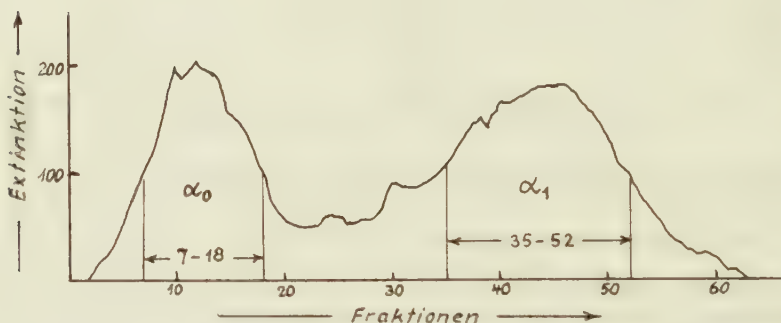


Abb. 4 Gegenstromverteilungsdiagramm von der Reinigung der α -Kette.

Versuchsbedingungen:

Unterphase: 1proz. DCA (25 ml); Oberphase: Butanol (2) 30 ml;

Temperatur 20° C; Menge an α -Kette: 1-1,5 g.

Ausgezogene Kurve: UV-Adsorption der vereinigten Ober- und Unterphase bei 280 m μ .

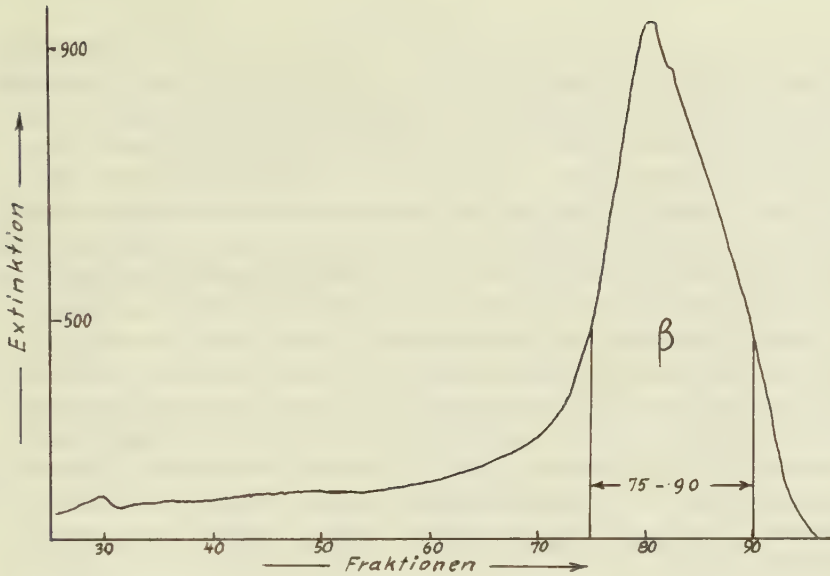


Abb. 5 Gegenstromverteilungsdiagramm von der Reinigung der β -Kette.
Versuchsbedingungen: siehe Abb. 4.

Die Extinktionsgipfel der Ketten besitzen nicht die theoretisch zu erwartende Glockenform. Es wird vermutet, dass am Protein haftende Fremdstoffe (Salze, Harnstoff) die Ursache dafür sind. Bei der Reinigung der α -Kette wurden zwei Fraktionen (α_0 u. α_1) erhalten (Abb. 4). Die dazugehörigen Eiweisstoffe ergeben nach fermentativer Spaltung die gleichen tryptischen Peptide. Es wird vermutet, dass das Protein des Gipfels α_0 das Dimere von α_1 ist.

Wegen der Bedeutung von hoch gereinigtem Kettenmaterial für die Zuordnung der tryptischen Peptide wurde auf eine gute Ausbeute kein grosser Wert gelegt. Die gesäuberte Komponente wurde einem nicht zu breiten Bereich des Gipfels (siehe Abb. 4 und 5) entnommen. Der Test auf Reinheit bringt bei diesen Fraktionen zufriedenstellende Ergebnisse; es wurden keine Verunreinigungen - weder qualitativ noch quantitativ - mehr festgestellt.

4.) Das Resultat.

Die quantitative Bestimmung der Bausteine beider Globinketten nach ihrer Hydrolyse mit Salzsäure gibt Aufschluss über die Aminosäurezusammensetzung. Die Werte der Aminosäuren von der α - und β -Kette sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Ausserdem enthält die Tabelle die Molanteile der Bausteine von Globin, die von der Arbeitsgruppe Moore bestimmt wurden¹⁷. Ein Vergleich zeigt eine gute Übereinstimmung.

Es wurden von jeder Kette zwei Analysen nach 20stündiger Hydrolyse durchgeführt. Obwohl es zweifelhaft ist, dass bei 20stündiger Hydrolyse sämtliche Peptidbindungen quantitativ gespalten werden, wurde auf eine Bausteinermittlung der Komponenten nach längerer Spaltungsdauer verzichtet, da ein Teil der Aminosäuren durch Zerstörung verloren geht. Das Verfahren von MOORE, SPACKMAN und STEIN¹⁴ zur quantitativen Erfassung der Aminosäuren arbeitet mit einer Genauigkeit $\pm 5\%$. Die Ergebnisse sind dementsprechend nicht unwiderruflich; sie dienen jedoch zur Kontrolle bei der Addition der einzelnen Aminosäuren aus allen tryptischen Peptiden. Ferner werden verschiedene Bausteine durch Säureeinwirkung mehr oder weniger zerstört. Bei der Berechnung der Serin- und Threoninwerte wird ein 10- bzw. 5proz. Verlust angenommen.¹⁵ Zur Bestimmung des Ammoniaks, der bei der Hydrolyse der Säureamide von Glutamin- und Asparaginresten entsteht, wird die 15proz. Abnahme der Hydroxyaminosäuren in Rechnung gestellt. Die Auswertung der Analysen erfolgt durch Ermittlung des kleinsten vorhandenen Vielfachen (bei der α -Kette zwei Methionine; bei der β -Kette ein Methionin). Die Aminosäuren Cystein und Tryptophan können infolge Zerstörung durch Hydrolyse nicht erfasst werden.

Tabelle 1. Molanteile der Aminosäuren von der α - und β -Kette
(Spalte a-g). Zahl der Aminosäuren von Human-Globin nach
Stein et al. ¹³ (MG. 33000).

Aminosäure	a	b	c	d	e	f	g	h
Lys	11,1	10,6	10,85	11,0	10,8	10,9	22	21
His	9,6	10,6	10,2	8,9	9,0	8,95	19	18
Arg	3,0	3,2	3,1	3,2	3,2	3,2	6	6
Asp	11,6	10,8	11,2	13,0	12,7	12,85	25	25
Thr	9,0	9,0	9,0	7,3	7,4	7,35	16	15
Ser	11,2	11,0	11,1	5,7	5,6	5,65	17	15
Glu	5,0	5,0	5,0	10,4	10,2	10,3	15	15
Pro	7,2	7,1	7,15	7,2	7,4	7,3	14	15
Gly	7,2	7,1	7,15	12,8	12,7	12,75	20	20
Ala	21,1	20,4	20,75	15,1	15,0	15,05	36	35
Cys	-	-	-	-	-	-	-	2-3
Val	13,2	13,2	13,2	17,4	17,0	17,2	30	32
Met	1,8	1,9	1,85	1,0	1,1	1,05	3	3
Ileu	0	0	0	0	0	0	0	0
Leu	18,0	17,7	17,85	17,9	17,9	17,9	36	36
Tyr	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	6	6
Phe	6,7	7,0	6,85	8,4	8,1	8,25	15	15
Try	-	-	-	-	-	-	-	-
Amid	[8,0]	[7,8]	[7,9]	[9,5]	[9,7]	[9,6]	[18]	-

Erklärung der Spalten: a und b: Werte der α -Kette;
c: Mittelwerte der α -Kette; d und e: Werte der β -Kette;
f: Mittelwerte der β -Kette; g: Summe der Mittelwerte von c u. f;
h: Ermittelte Molanteile der Aminosäuren von Human-Globin
nach STEIN et al. ¹³.

B. Die löslichen tryptischen Peptide.

1.) Die Darstellung.

Die Problematik. Bei der Erschliessung der Human-Globinstruktur bilden die tryptischen Peptide eine zentrale Zwischenstufe. Zur Ermittlung der Aminosäuresequenz kleinerer Bruchstücke werden ausschliesslich die tryptischen Spaltprodukte als Ausgangsmaterial benutzt. Die Bestimmung der Reihenfolge von tryptischen Peptiden innerhalb der Polypeptidkette erfordert ihre genaue Kenntnis. In Abb. 6 wird schematisch der Untersuchungsvorgang zur Strukturermittlung von Human-Globin gezeigt.

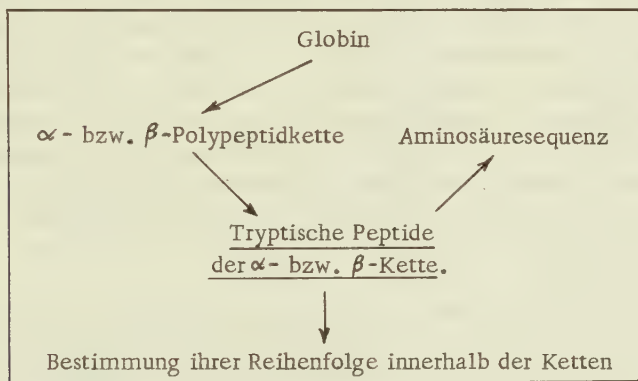


Abb. 6 Schematische Übersicht der Untersuchungen zur Ermittlung der Struktur von Human-Globin.

Zwei Voraussetzungen sind bei der Peptiddarstellung zu erfüllen, um die Ermittlung einer fehlerlosen Konstitutionsformel zu gewährleisten.

1. Die fermentative Spaltung muss reproduzierbar sein. Es dürfen keine Nebenprodukte entstehen.
2. Sämtliche Peptide müssen in guten Ausbeuten gebildet werden.

Die tryptischen Spaltungsversuche von LIEBOLD¹⁶ schienen diese Forderungen zu erfüllen. Bei der Untersuchung aller tryptischen Spaltprodukte von Globin wurde beobachtet, dass bei zu langer enzymatischer Verdauung (24h) auch Nebenprodukte entstehen. Das erhaltene Tripeptid (Glu, Gly, Ala) wurde als Sekundärprodukt erkannt, nachdem die Hydrazinolyse der α-Komponente keine der drei Aminosäuren, sondern Ornithin - das Abbauprodukt von Arginin - als C-terminalen Baustein ergeben hatte.

Die Behandlung des hochgereinigten Trypsins mit verdünnter HCl beseitigt demnach nicht vollständig eine vorhandene Chymotrypsin-Aktivität. Diese bewirkt bei langer Hydrolysedauer "nicht erlaubte" Spaltungen.

Die Modifikation. Die Verdauungszeit wurde um das Vierfache verkürzt. Um keinen zu grossen Ausbeuteverlust hinzunehmen, wurden die Polypeptidketten für kurze Zeit bei einem pH von 7,0 "angedaut". Bei dieser H^+ -Ionenstärke ist die Globinkettensuspension nicht flockig sondern feindispers, so dass das Ferment wirksamer angreifen kann.

Das Resultat. Bei verkürzter Trypsineinwirkung findet die Spaltung der Peptidbindung ausschliesslich am C-terminalen Ende der Aminosäurereste von Lysin und Arginin statt. Nebenprodukte wurden nicht festgestellt.

Die Ausbeuten an einigen tryptischen Peptiden sind massig. Ferner werden zwei tryptische Spaltprodukte mit zwei Lysylresten gefasst; sie konnten als ditryptische Peptide identifiziert werden. Somit geben die modifizierten Spaltungsbedingungen Aufschluss über die proteolytische Affinität des Trypsins. Bei der Trypsineinwirkung wird - wie bei anderen Fermenthydrolysen - die Spaltungsgeschwindigkeit von den benachbarten Bausteinen des spezifischen Spaltungsortes (Lys, Arg) bestimmt. Die Sequenzstudien an den tryptischen Peptiden, die mit geringerer Ausbeute erhalten wurden, besagen, dass die sauren Bausteine, die der zu spaltenden Lysyl- bzw. Arginylbindung benachbart sind, eine spürbare Hemmung verursachen.

2.) Die Fraktionierung.

Die Auftrennung eines tryptischen Peptidgemisches aus Globin wurde von RUDLOFF⁷ mit dem Anionenaustauscher Dowex 1/X2 im Acetatzzyklus untersucht. Das Verfahren wurde ohne Änderung der Bedingungen für die Fraktionierung der löslichen fermentativen Verdauungsgemische von α - und β -Kette angewendet. Als Ausgangsmaterial werden sowohl gereinigte als auch ungereinigte Globinketten benutzt. Den Erfolg der Auftrennungen tryptischer Peptidgemische aus gereinigtem Material zeigen die Abbildungen 7 und 8.

Allgemeine Erscheinungen. Bei den säulenchromatographischen Untersuchungen wurde beobachtet, dass das Auflösungsvermögen der von der Säule zuerst zu eluierenden Peptide unterschiedlich ist. Die Säulenchromatogramme (Abb. 7 u. 8) der tryptischen Spaltprodukte aus den Ketten zeigen eine unvollständige Trennung der Fraktionsgipfel 2 und 3. Worauf diese Erscheinung beruht, konnte nicht festgestellt werden. Bei der Aufarbeitung wurden die Elutionsflüssigkeiten der Doppelgipfel in zwei Fraktionen gesammelt. Da die Fraktionsgipfel ausserordentlich steil sind, wird bei dem Doppelgipfel der Peptide aus der β -Kette (Abb. 8) eine vollständige Trennung in verschiedene Bestandteile erreicht.

Die Fraktionierung von Peptiden mit dem Harz Dowex 1/X2 erfolgt ohne spezifischer Wechselwirkung gewisser Gruppen (aromatische Aminosäuren) mit der Matrix des Austauschers. Lediglich die Nettoladung des Eiweisspaltproduktes ist für den Austausch verantwortlich. Am Anfang der Elution verlassen die basischen, dann die neutralen und schliesslich die sauren Peptide die Säule. Beim Vergleich

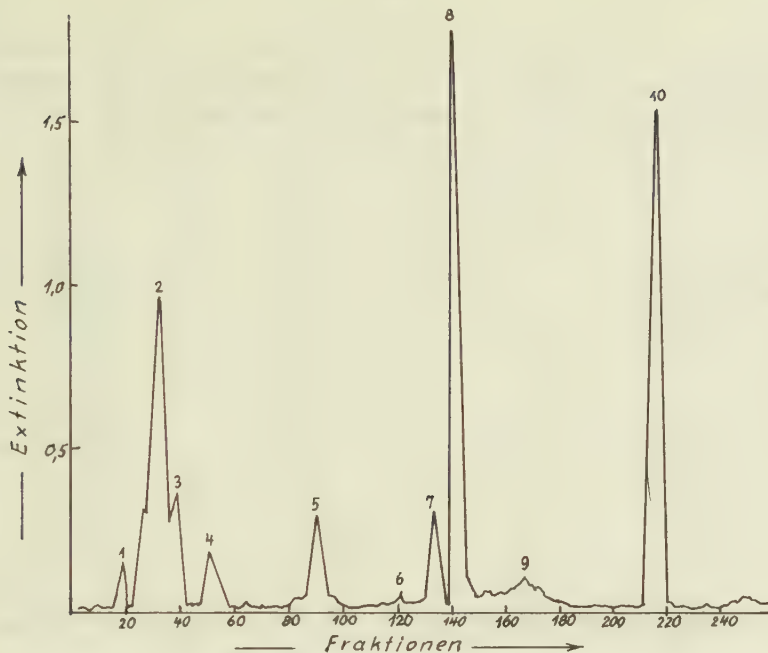


Abb. 7 Säulenchromatographische Analyse der tryptischen Peptide aus der α -Kette über Dowex 1/X2, 200-400 mesh

Versuchsbedingungen:

Säulengröße: 150 x 1,8 cm

Elutionslösung: 1% Coll-Ac-Puffer pH $\approx$ 8,1

1. Gradient: (1% Coll- + 1% Pyr-Ac-Puffer pH 7,5) + 0,1n HAc.

2. Gradient: (" ") + 2n HAc.

Elutionsgeschwindigkeit: 33 ml/h.; Temp.: 35° C.

Ausgezogene Kurve: Ninhydrinfarbe der Fraktionen nach alkalischer Hydrolyse.

der Säulenchromatogramme (Abb. 7 und 8) fällt auf, dass die Fraktionsgipfel 1, 2, 3, 5, 8 und 10 in Abb. 7 beim gleichen pH erscheinen wie die Extinktionsgipfel 1, 2, 3, 5, 10 und 14 in Abb. 8. Die Nettoladungen der Peptide beider Ketten sind einander ähnlich, so dass die schwierige säulenchromatographische Kettentrennung bzw. Reinigung verständlich wird.

Resultat. Die Wirksamkeit der säulenchromatographischen Fraktionierung der tryptischen Spaltprodukte wird durch Übersichtschromatogramme veranschaulicht.

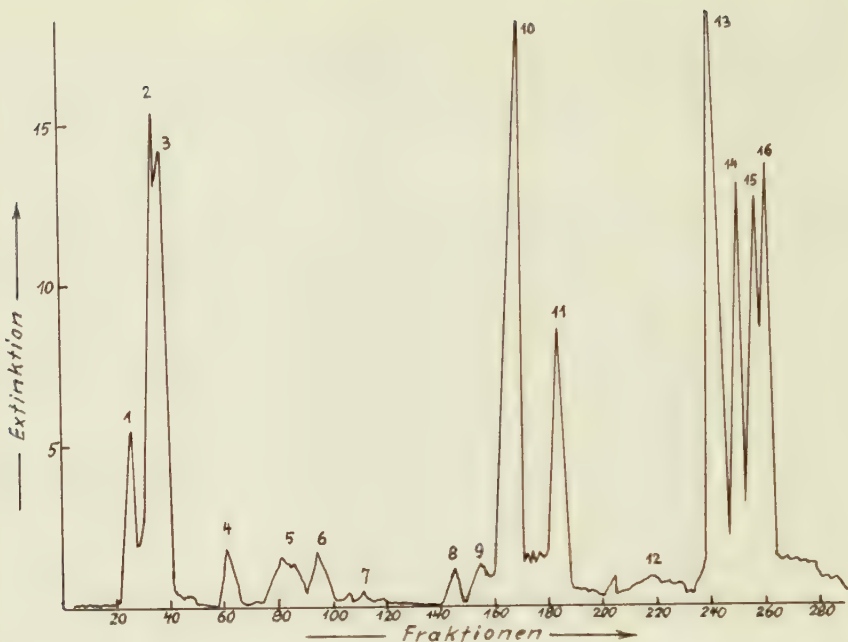


Abb. 8 Säulenchromatographische Analyse der tryptischen Peptide aus der β -Kette über Dowex 1/X2, 200-400 mesh.

Versuchsbedingungen:

Säulengröße: 150 x 1,8 cm.

Elutionslösung: 1% Coll-Ac-Puffer pH = 8,1

1. Gradient: (1% Coll- + 1% Pyr-Ac-Puffer pH 7,5) + 0,1n HAc.

2. Gradient: (" ") + 2n HAc.

Elutionsgeschwindigkeit: 33 ml/h. Temp.: 35° C.

Ausgezogene Kurve: Ninhydrinfarbe der Fraktionen nach alkalischer Hydrolyse.

α -Kette

Die Peptide der 10 Fraktionsgipfel (Abb. 7) ergeben das Verteilungschromatogramm der Abb. 9. Es zeigt 13 stark (ausgezogene Umrandungen) und zwei schwach gefärbte (gestrichelte Umrandungen) Flecken. Die Untersuchung der geringen Peptidmenge von Fraktion 3 und 7 ergeben die gleichen Aminosäurezusammensetzungen der Spaltprodukte in den Nachbarfraktionen 2 bzw. 8 mit denselben Wanderungsgeschwindigkeiten. Die Fraktionen 6 und 9 zeigen auf dem Papier keine Anfärbung; sie werden nicht weiter untersucht. Die Verteilung der basischen Aminosäurereste Arginin und Histidin sowie der Bausteine Tyrosin und Tryptophan in

den Peptiden wurde durch Sprühteste ermittelt. Im Zusammenhang mit den Bausteinanalysen der Globinketten (Tabelle 1) wurde festgestellt, dass die Arginyl-, Tyrosyl- und Tryptophanylreste jeweils einzeln in den Spaltprodukten vorkommen. Ferner wurde eine schlechte Trennfähigkeit der Peptide von Fraktion 8 bemerkt.



Abb. 9 Übersichtschromatogramm der fraktionierten Peptide aus der α -Kette.

Versuchsbedingungen:

Menge: 100ste Teil der Stammlösung (0,1 μ mol) pro Peptid.

Chromatographie-System: Partridge (absteigend)

Farbreagens: 0,1proz. Ninhydrinlösung; Arg.-Test: ;

Tyr-Test: ; His-Test: ; Try-Test: ;

β -Kette

Die Chromatographie der 16 Fraktionen aus der β -Kette ist in Abb. 10 zu sehen. Es wurde bei der Fraktionierung eine grössere Auflösung als bei den Peptiden aus der α -Kette erzielt. Von den 16 Fraktionen erhält man 16 stark gefärbte Flecken (ausgezogene Umrandung). Zwei Fraktionen zeigen am Papier keine Ninhydrinanfärbung. In vier Flecken sind nur geringe Mengen (gestrichelte Umrandung). Eigenartigerweise sind beide Flecken von Gipfel 6 identisch mit den Peptiden von Gipfel 5. Fraktion 13 ergibt in der Papierchromatographie einen grossen verschmierten Fleck, der bei den verschiedenen Sprühtreaktionen jeweils positiv ausfällt. Da jedoch in den übrigen Fraktionen bereits sämtliche Arginyl-, Tyrosyl- und Tryptophanylreste der β -Kette erfasst worden sind, dürfte es sich um ein grösseres unvollständig gespaltenes Bruchstück der Kette handeln.



Abb. 10 Übersichtschromatogramm der fraktionierten Peptide aus der β -Kette.
Versuchsbedingungen:

Menge: 100ste Teil der Stammlösung (0,1 μ mol pro Pept.)

Chromatographie-System: Partridge (absteigend)

Farbreagens: 0,1proz. Ninhydrinlösung; Arg-Test: ;

Tyr-Test: ; His-Test: ; Try-Test: ;

3.) Die Analysen.

Die durch quantitative Vermessung erhaltenen Formeln sämtlicher stark gefärbter Spaltprodukte (Abb. 9 und 10) von der α - und β -Kette sind in den Tabellen 2 und 3 wiedergegeben.

Die Reinigung der Peptid-Stammlösungen wurde mit Verteilungschromatographie im Partridgesystem bzw. mit Hochspannungselektrophorese bei pH 6,4 am Papier ausgeführt. Die Analysen der Peptide wurden nach 20-stündiger Hydrolyse durchgeführt. Geänderte Bedingungen bei der Reinigung bzw. Hydrolyse sind bei der Besprechung der einzelnen Peptide vermerkt worden.

Die Betrachtung der Peptide geschieht in der Reihenfolge, wie diese bei der chromatographischen Fraktionierung die Säule verlassen. Über den grössten Teil der tryptischen Peptide wurde in einer vorläufigen Kurzmittteilung¹⁷ bereits berichtet. Die dort angegebene Peptidbezeichnung (HT_{α} --; HT_{β} --) wird beibehalten. Die angewendeten Reinigungsverfahren, sowie die Angabe der relativen Wanderungsgeschwindigkeiten werden in summarischer Form wiedergegeben. Bei der Papierchromatographie im Partridgesystem gilt hierbei als Bezugseinheit die Aminosäure Leucin = 1 (R_{Leu}); bei der Papierhochspannungselektrophorese mit dem Pyr-Ac-Puffer pH 6,4 die Aminosäure Lysin = 1 (R_{Lys}). Ferner wird der Fraktionsgipfel angeführt, in welchem das zu besprechende Bruchstück erscheint.

Tabelle 2 Die Molanteile der Aminosäuren der tryptischen Peptide aus der α -Kette.

Peptid Aminosäure	HT α 1	HT α 2	HT α 3	HT α 4	HT α 5	HT α 6	HT α 7	HT α 8	HT α 10	HT α 13	HT α 9	HT α 11	HT α 12
Lys	+	2,02	1,17 0,95		1,00	1,00		0,93	1,08	0,97	1,06 2,07	0,92 2,85	0,91 0,95
His							+						
Arg				+									
Asp		1,30			1,14				1,13	2,03	1,08	5,86	
Thr		1,05			0,85	1,91					0,82	1,13	
Ser		0,88				0,98			1,18		1,80	1,98	
Glu											0,97		2,99
Pro		0,97				0,85			0,95	1,04	1,03	1,04	
Gly			1,96					1,06			1,09		3,00
Ala		1,29						2,00	0,96		1,10	7,08	3,91
Val		1,80			1,02				0,77	2,05	1,08	2,97	1,07
Met						0,95						0,79	
Leu		0,99		+		1,13			0,93		1,10	4,13	0,99
Tyr							+				0,77		0,78
Phe						2,11				0,91	1,94		
Try								+					

Tabelle 3 Die Molantelle der Aminosäuren der tryptischen Peptide aus der β -Kette.

Peptid Aminosäure	HT β 1	HT β 4	HT β 2	HT β 3	HT β (4+8)	HT β 5	HT β 6	HT β 7	HT β 8	Start-*) fleck v. Fr. 10	HT β 9	HT β 10	HT β 11	HT β 12
Lys	+	1,00	0,97	1,03	0,93	1,00		1,00	+	1,75	0,91	0,92		1,08
His		1,00	1,02		1,60					1,60	1,09	1,04		
Arg							0,72						1,00	
Asp		0,94			1,00					2,71		3,02	1,81	2,87
Thr						0,89	1,08	1,00		1,10	0,87			0,95
Ser						0,92				1,11		0,89		2,00
Glu							1,13	2,98		1,70	1,98		1,84	0,99
Pro							0,95	2,18			1,11			2,02
Gly		1,09	1,02		1,20	1,09				2,48		2,10	2,84	1,10
Ala		4,16	0,96		3,48	2,00		2,22		3,24		2,12	1,06	1,10
Val		2,79		0,70	1,84	1,09	1,95	1,12		2,15	0,95	0,96	3,04	1,00
Met														0,85
Leu		1,10			0,94	1,08	1,91			4,30	1,10	4,05	1,00	1,12
Tyr					+		+	0,88	+					
Phe						+		0,95		1,60		1,01		
Try							+							2,84

*) + 0.33 CysO_3H

Vor der quantitativen Vermessung eines Spaltproduktes wurde seine Einheitlichkeit nach der Reinigung durch Anfertigung eines ein- oder zweidimensionalen Aminosäurechromatogrammes geprüft. Bei den Peptiden mit nur zwei verschiedenen Bausteinen wird in vielen Fällen auf eine quantitative Ermittlung verzichtet. Die qualitativen Ergebnisse wurden bei den Untersuchungen über die Peptidzuordnung quantitativ bestätigt.

Die Analysen ergeben Peptidausbeuten - einschliesslich dem Verlust durch die Reinigung am Papier - zwischen 20 und 70%. Auf eine Bestimmung der Säureamide in den Spaltprodukten wurde verzichtet, da bei den angewendeten Reinigungsverfahren (z.B. Elution des Peptides vom Papier mit Säure) nicht reproduzierbare Mengen an Ammoniak aufgenommen werden; dadurch wird eine genaue Amidbestimmung unmöglich gemacht.

Die tryptischen Peptide der α -Kette.

Es wurden die 13 tryptischen Hauptkomponenten (Abb. 9) analysiert.

HT α 1 - Lysin

Reinigung: Elektrophorese

$R_{\text{Leu}} = 0,15$; $R_{\text{Lys}} = 1,0$; Fraktionsgipfel: 1

Um Polylysin auszuschliessen, das annähernd den gleichen R_{Leu} - und R_{Lys} -Wert wie Lysin besitzt, wurde die Wanderungsgeschwindigkeit des Spaltproduktes nach Reinigung im Aminosäureanalysator ermittelt. Die Beweglichkeit stimmt mit der von Lysin überein.

HT α 2 = HT α (5+10) - Lys 1,73; Asp 1,30; Thr 1,05; Ser 0,88;
Pro 0,97; Ala 1,29; Val 1,80; Leu 0,98;

Reinigung: Papierchromatographie

$R_{\text{Leu}} = 0,13$; $R_{\text{Lys}} = 0,30$; Fraktionsgipfel: 2

Das Peptid wurde erst nach verkürzter tryptischer Hydrolyse in mässiger Ausbeute gefunden. Die Basteinanalyse zeigt die Summe der Aminosäuren von den Peptiden HT α 5 und HT α 10. Es handelt sich demnach um ein ditryptisches Peptid.

HT α 3 - Lys 1,17; His 0,95; Gly 1,96;

Reinigung: Elektrophorese oder Papierchromatographie

$R_{\text{Leu}} = 0,04$; $R_{\text{Lys}} = 0,75 - 0,85$; Fraktionsgipfel: 2

Wegen des N-terminalen Glycinrestes wird das Peptid beim Besprühen des Chromatogrammes nur schlecht angefärbt. Zur Sichtbarmachung ist längeres Erhitzen (bei 100° C) notwendig. Dabei wird jedoch der N-terminale Aminosäurerest quantitativ zerstört.

Das Peptid wird ohne Anfärbung anhand seines R_{Leu} - bzw. R_{Lys} -Wertes gewonnen. Durch Sequenzstudien wurde die Analyse bestätigt.¹⁸

HT α 4 - Leu-Arg

Reinigung: Papierchromatographie

$R_{\text{Leu}} = 0,52$; $R_{\text{Lys}} = 0,66$; Fraktionsgipfel: 2

Die Aminosäurebestimmung des Peptides wird mittels eines eindimensionalen Chromatogrammes durchgeführt. Bei der Zuordnung tryptischer Peptide wurde das Molverhältnis Leu : Arg = 1 : 1 quantitativ erfasst.¹⁹

HT α 5 - Lys 1,00; Asp 1,14; Thr 0,85; Val 1,02;

Reinigung: Elektrophorese oder Papierchromatographie

$R_{\text{Leu}} = 0,20$; $R_{\text{Lys}} = 0,55$; Fraktionsgipfel: 2

Die Ausbeute dieses Peptides ist bei verkürzter Hydrolyse geringer als bei 24-stündiger tryptischer Hydrolyse; es tritt bei diesen Bedingungen als Bruchstück des ditryptischen Peptides HT α 2 auf.

HT α 6 - Lys 1,00; Thr 1,91; Ser 0,98; Pro 0,85; Met 0,95; Leu 1,13; Phe 2,11;

Reinigung: Papierchromatographie

$R_{\text{Leu}} = 0,86$; $R_{\text{Lys}} = 0,32$; Fraktionsgipfel: 4

Das Peptid ist die einzige Komponente des Fraktionsgipfels. Somit ist die Reinigung wesentlich erleichtert. Die Analyse wurde durch Ermittlung der Aminosäuresequenz gesichert¹⁸.

HT α 7 - Tyr-Arg

Reinigung: Papierchromatographie

$R_{\text{Leu}} = 0,42$; $R_{\text{Lys}} = 0,3$; Fraktionsgipfel: 5

Bei diesem Peptid handelt es sich um das C-terminale Ende der α -Kette. Die Konstitutionsformel wurde mit den Versuchen zur Peptidzuordnung innerhalb der α -Kette bestätigt¹⁹.

HT α 8 - Lys 0,93; Gly 1,06; Ala 2,00; Try +;

Reinigung: Papierchromatographie

$R_{\text{Leu}} = 0,37$; $R_{\text{Lys}} = 0,3$; Fraktionsgipfel: 5

In diesem Peptid wurde Tryptophan mit dem Sprühtest nachgewiesen. Die gefundenen Molanteile wurden durch die Sequenzstudien von LIEBOLD²⁰ bewiesen.

HT α 10 - Lys 1,08; Asp 1,13; Ser 1,18; Ala 0,96; Pro 0,95; Val 0,77; Leu 0,93;

Reinigung: Papierchromatographie

$R_{\text{Leu}} = 0,47$; $R_{\text{Lys}} = 0,15$; Fraktionsgipfel: 7

Das Peptid wurde bei der Trennung eines Peptidgemisches aus ungereinigter α -Kette in einem Fraktionsgipfel zusammen mit den Spaltprodukten HT α 9 und HT α 11 gefunden. Dieser Umstand erschwert die Reinigung und führt zu schlechten Bausteinanalysen. Die Aminosäurezusammensetzung des Peptides stimmt mit der von SCHROEDER ²¹ mitgeteilten N-terminalen Sequenz der Kette überein. HT α 10 ist demnach das N-terminale tryptische Bruchstück. Die endständige Aminosäure Valin wird durch die Sprühtestreaktion (mit 0,02% Ninhydrin) zum Teil zerstört. Der Wert der Aminosäure ist deshalb etwas zu niedrig.

HT α 13 - Lys 0,97; Asp 2,03; Pro 1,04; Val 2,05; Phe 0,91;

Reinigung: Papierchromatographie und Elektrophorese

$R_{\text{Leu}} = 0,41$; $R_{\text{Lys}} = 0,15 - 0,20$; Fraktionsgipfel: 7

Das Peptid fällt bei verkürzter fermentativer Hydrolyse nur in mässigen Ausbeuten an. Durch die Notwendigkeit einer doppelten Reinigung konnte mit der erhaltenen Menge nur eine Analyse mittels eines zweidimensionalen Chromatogrammes durchgeführt werden. Bei 24-stündiger Trypsineinwirkung auf Globin wurde das Peptid in guten Ausbeuten erhalten. Von LIEBOLD ²⁰ wurde die Sequenz ermittelt.

HT α 9 - Lys 1,06; His 2,07; Asp 1,08; Thr 0,82; Ser 1,80;
Glu 0,97; Pro 1,03; Gly 1,09; Ala 1,10; Val 1,08;
Leu 1,10; Tyr 0,77; Phe 1,94

Reinigung: Isoamylalkoholsystem I Rf-Wert: 0,25

$R_{\text{Leu}} = 0,1 - 0,25$; $R_{\text{Lys}} = 0,15 - 0,2$; Fraktionsgipfel: 8

Das Übersichtchromatogramm in Abb. 9 zeigt, dass zur Gewinnung des Spaltproduktes die Papierchromatographie mit dem Partridgesystem nicht geeignet ist. Bei der Reinigung durch Pherographie mit verschiedenen Puffern (pH 3,6 und pH 6,4) wurde eine scheinbare Einheitlichkeit im zweidimensionalen Aminosäurechromatogramm erzielt, die Analysenwerte zeigen jedoch Ungenauigkeiten. Eine mehrmalige Reinigung bringt grosse Substanzverluste und keine Besserung ¹⁷.

Durch geänderte papierchromatographische Bedingungen erhält man zufriedenstellende Resultate.

Die angegebenen Werte des Peptides sind Durchschnittswerte aus drei Analysen nach 40-stündiger Totalhydrolyse. Bei langer Hydrolysedauer werden die Tyrosinanteile oft weitgehend zerstört. Es wird der Wert mit dem geringsten Verlust angegeben.

HT α 11 - Lys 0,92; His 2,85; Asp 5,86; Thr 1,13; Ser 1,98;
Pro 1,04; Ala 7,08; Met 0,79; Val 2,97; Leu 4,13;

Reinigung: Pyridinsystem I, Rf-Wert: 0,4

$R_{\text{Leu}} = 0,1 - 0,2$; $R_{\text{Lys}} = 0,1$; Fraktionsgipfel: 8

Bei der Fraktionierung des tryptischen Peptidgemisches aus Globin erscheint das Peptid allein in einem Extinktionsgipfel. Die Säuberung aus einer Lösung mit zwei Komponenten ($HT_{\alpha}9$ und $HT_{\alpha}11$) ist schwierig. Auch hier versagen die Reinigungsverfahren mit Standardbedingungen. Es handelt sich um das grösste lösliche tryptische Abbauprodukt des Human-Globins.

$HT_{\alpha}12$ - Arg 0,95; His 0,91; Glu 2,99; Gly 3,00; Ala 3,91;
Val 1,07; Leu 0,99; Tyr 0,78;

Reinigung: Papierchromatographie

$R_{Leu} = 0,22$; $R_{Lys} = -0,08$; Fraktionsgipfel: 10

Das Peptid wird wie $HT_{\alpha}6$ ohne eine Nebekomponente säulenchromatographisch gewonnen. Die Sequenzuntersuchungen von LIEBOLD und MÜLLER¹⁸ unterstreichen die Richtigkeit der gefundenen Werte.

Die tryptischen Peptide der β -Kette.

Es wurden sämtliche 16 stark gefärbten Ninhydrinflecken (Abb. 10) auf ihre Aminosäurezusammensetzungen untersucht.

$HT_{\beta}1$ - Lysin

Reinigung: Elektrophorese

$R_{Leu} = 0,12$; $R_{Lys} = 1,0$; Fraktionsgipfel: 1

Der R_{Leu} - und R_{Lys} -Wert des tryptischen Spaltproduktes sprechen für freies Lysin. Die säulenchromatographische Analyse bestätigt diese Annahme.

$HT_{\beta}4$ - Lys 1,00; His 1,00; Asp 0,94; Gly 1,09;
Ala 4,16; Val 2,79; Leu 1,10;

Reinigung: Papierchromatographie oder Elektrophorese

$R_{Leu} = 0,25$; $R_{Lys} = 0,40$; Fraktionsgipfel: 1

Beim säulenchromatographischen Versuch mit ungereinigter β -Kette erscheint das Spaltprodukt unerklärlicherweise in der 3. Fraktion. Die Ausbeute ist durch unvollständige tryptische Verdauung gering. Ein erheblicher Anteil kommt als Bestandteil des ditryptischen Peptides $HT_{\beta}(4+8)$ vor. Das Abbauprodukt besitzt sehr säurestabile Peptidbindungen. Bei 20-stündiger Totalhydrolyse werden für Alanin 3 und für Valin 2 Molanteile bestimmt¹⁷, während bei 40-stündiger Säureeinwirkung die angegebenen Werte erhalten werden.

$HT_{\beta}2$ - Lys 0,97; His 1,02; Gly 1,02; Ala 0,96;

Reinigung: Elektrophorese oder Papierchromatographie

$R_{Leu} = 0,04$; $R_{Lys} = 0,75$; Fraktionsgipfel: 2

Das Peptid hat die gleichen elektrophoretischen, papier- und säulenchromatographischen Eigenschaften wie $HT_{\alpha}3$. In der Aminosäurezusammensetzung sind beide Spaltprodukte sehr ähnlich. Lediglich das N-terminale Glycin von $HT_{\alpha}3$ ist durch Alanin ersetzt worden. Dadurch ist das Peptid bei Anfärbung mit verdünnter Ninhydrinlösung besser sichtbar als $HT_{\alpha}3$. Eine Zerstörung der N-terminalen Aminosäure wird hierbei nicht beobachtet. Die Struktur des Peptides wurde bereits ermittelt ²⁰.

$HT_{\beta}3$ - Lys 1,03; Val 0,70;

Reinigung: Elektrophorese

$R_{Leu} = 0,3$; $R_{Lys} = 0,8$; Fraktionsgipfel: 3

$HT_{\beta}(4+8)$ - Lys 0,93; His 1,60; Asp 1,00; Gly 1,20;
Ala 3,48; Val 1,84; Leu 0,94; Tyr +;

Reinigung: Papierchromatographie

$R_{Leu} = 0,12$; $R_{Lys} = 0,42$; Fraktionsgipfel: 4

Obwohl die Bausteinanalyse des Spaltproduktes nach 20-stündiger Säurehydrolyse in Bezug auf Einheitlichkeit unbefriedigend ist, weisen Endgruppenbestimmungen darauf hin, dass es sich hierbei um das ditryptische Peptid des C-terminalen Endes der Kette handelt. Bei einem einfachen tryptischen lysylhaltigen Spaltprodukt ist die C-terminale Aminosäure: Lysin. Die am Peptid durchgeführten Versuche mit Carboxypeptidase zeigen jedoch wie bei der β -Kette als Endgruppe die Aminosäure Histidin.

$HT_{\beta}5$ - Lys 1,00; Thr 0,89; Ser 0,92; Gly 1,09;
Ala 2,01; Val 1,09; Leu 1,08; Try + ..

Reinigung: Papierchromatographie

$R_{Leu} = 0,55$; $R_{Lys} = 0,35$; Fraktionsgipfel: 5

Das Peptid ist leicht zu reinigen. Der Tryptophanylrest, der bei saurer Hydrolyse zerstört wird, wurde im Peptidverband mit einem spezifischen Sprühtest ermittelt. Die Sequenzbestimmung von MÜLLER ¹⁸ stützt die gefundenen Werte.

$HT_{\beta}6$ - Arg 0,72; Thr 1,08; Glu 1,13; Pro 0,95;
Val 1,95; Leu 1,91; Tyr +; Try + ;

Reinigung: Papierchromatographie

$R_{Leu} = 0,95 - 1,0$; $R_{Lys} = 0,18$; Fraktionsgipfel: 5

Das Peptid ist eines der labilsten Spaltprodukte aus Human-Globin. Bei den qualitativen Analysen wurden in den zweidimensionalen Aminosäurechromatogrammen oft Flecken beobachtet, die keiner Aminosäure zugeordnet werden konnten.

Offensichtlich sind es Zersetzungsprodukte von labilen Aminosäuren (Tyr; Try). Demzufolge wurden nach 20-stündiger Totalhydrolyse bei der quantitativen Aminosäurevermessung nur noch Spuren an Tyrosin nachgewiesen.

HT_p 7 - Lys 1, 02; Thr 0, 98; Pro 2, 18; Glu 2, 98; Ala 2, 22;
Val 1, 12; Tyr 0, 88; Phe 0, 95;

Reinigung: Papierchromatographie

$R_{Leu} = 0, 23$; $R_{Lys} = 0, 18$; Fraktionsgipfel: 8

Das Peptid zeigt trotz einer guten säulenchromatographischen Fraktionierung nach der Reinigung beim qualitativen Test stets Verunreinigungen an "Fremdaminosäuren". Die N-terminale Aminosäure ist Glutaminsäure. Dies ist ~~allen~~ ^{allen} Anschein nach der Grund, warum das Peptid nach verkürzter enzymatischer Spaltung in geringen Ausbeuten vorkommt (siehe "Darstellung der Peptide").

HT_p 8 - Tyr-His

Reinigung: Papierchromatographie

$R_{Leu} = 0, 33$; $R_{Lys} = 0, 5$; Fraktionsgipfel: 10

Das Peptid ist das einzige tryptische Spaltprodukt aus Human-Globin ohne Lysin bzw. Arginin. Es bildet das C-terminale Ende der Kette (siehe HT_p(4+8)).

Da das Dipeptid säurelabile Bausteine besitzt, ist eine quantitative Bausteinanalyse nicht möglich, denn eine genaue Bestimmung des kleinsten Vielfachen kann nicht vorgenommen werden. Die Versuche über die Peptidzuordnung von HILSCHMANN ²² bestätigen die Sequenz.

Startfleck der Fraktion 10

Sowohl in der Pherographie als auch in der Papierchromatographie wandert das Bruchstück nicht. Es wird vermutet, dass ein unvollständig gespaltenes Produkt der Kette vorliegt.

HT_p 9 - Lys 0, 91; His 1, 09; Thr 0, 87; Glu 1, 98; Pro 1, 11;
Val 0, 95; Leu 1, 10;

Reinigung: Papierchromatographie

$R_{Leu} = 0, 2$; $R_{Lys} = 0, 25$; Fraktionsgipfel: 11

Beim säulenchromatographischen Versuch aus ungereinigter Kette wurde eine Peptidtrennung von HT_p 9 und HT_p 10 erzielt. Das Spaltprodukt ist schon längere Zeit bekannt. Beim Hämoglobin S findet nach INGRAM im Bereich dieses Bruchstückes ein spezifischer Aminosäureaustausch statt. Die gefundenen Werte stimmen mit den neueren Untersuchungen von INGRAM ²³ überein.

HT _{β} 10 - Lys 0,92; His 1,04; Asp 3,02; Ser 0,89; Gly 2,10;
Ala 2,12; Val 0,96; Leu 4,05; Phe 1,01;

Reinigung: Elektrophorese

$R_{\text{Leu}} = 0,13$; $R_{\text{Lys}} = 0,15$; Fraktionsgipfel: 11

Die elektrophoretische Gewinnung führt zu klaren Ergebnissen, auch wenn das Peptid mit HT _{β} 9 in einer Fraktion vorliegt.

Fraktion 13

Da eine Reinigung dieser Fraktion misslingt, konnte eine genaue Bausteinanalyse nicht ausgeführt werden. Wahrscheinlich handelt es sich um ein Gemisch aus ungespaltener Kette und isoelektrisch fällbaren Peptiden, die beim isoelektrischen Punkt zum geringen Prozentsatz in Lösung bleiben.

HT _{β} 11 - Arg 1,00; Asp 1,81; Glu 1,84; Gly 2,84;
Ala 1,06; Val 3,04; Leu 1,00;

Reinigung: Papierchromatographie

$R_{\text{Leu}} = 0,4$; $R_{\text{Lys}} = -0,19$; Fraktionsgipfel: 14

Das Peptid wurde bereits von HUNT²⁴ beschrieben. Eine annähernd gute Analyse wurde erst nach 48-stündiger Säurehydrolyse erhalten.

HT _{β} 12 - Lys 1,08; Asp 2,87; Thr 0,95; Ser 2,00; Glu 0,99;
Pro 2,02; Gly 1,10; Val 1,00; Met 0,85; Ala 1,10;
Leu 1,12; Phe 2,84,

Reinigung: Isoamylalkoholsystem II, Rf-Wert: 0,25 - 0,45

$R_{\text{Leu}} = 0,45 - 0,65$; $R_{\text{Lys}} = -0,25$; Fraktionsgipfel: 15 + 16

Die Reinigung im Isoamylalkoholsystem gelingt gut. Das Peptid wandert als scharfe Bande. Die Flecken am Papier sind nach Reaktion mit verdünnter Ninhydrinlösung wie bei HT _{α} 3 schwach grau gefärbt. Bei einigen Analysen wurde ein Verlust des N-terminalen Phenylalanylrestes festgestellt.

Das Peptid kommt in zwei Fraktionen vor. Für die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit bei der Ionenaustausch- und Papierchromatographie ist eine partielle Oxydation des Methioninrestes zum Methioninsulfoxyrest verantwortlich zu machen.

4.) Kritik.

Bei den proteolytischen Abbauprodukten der α -Kette wurden alle Hauptkomponenten eindeutig als tryptische Peptide erkannt, bei denen der β -Kette sind die Analysen zweier Produkte (Startfleck der Fraktion 10 und Fraktion 13) nicht als tryptische Bruchstücke zu deuten. Dieser Befund ist keineswegs beunruhigend, wenn man bedenkt, dass das Ferment Trypsin nicht das gesamte Kettenmaterial, sondern nur 60-70% spaltet.

Bei der α -Kette macht sich die partielle Spaltung nicht bemerkbar, da bei der Entfernung des isoelektrisch fällbaren Anteils des verdauten Gemisches die ungespaltene Kette wegen ihrer kleinen Löslichkeit nahezu quantitativ mit ausfällt.

Im Gegensatz dazu ist die Löslichkeit der β -Kette und der fällbaren Peptide am isoelektrischen Punkt weitaus grösser, so dass ein erheblicher Teil mit den löslichen Peptiden in zwei Fraktionen aufgetrennt wird.

Weiterhin fällt bei der Betrachtung der tabellierten Molanteile der tryptischen Peptide (siehe Tabelle 2 und 3) auf, dass einige wenige Werte bis zu 20% vom theoretischen abweichen. Nach einer privaten Mitteilung von Professor Deutsch wurde von der Arbeitsgruppe MOORE die Abnahme der Aminosäuren durch Säurebehandlung untersucht. Dabei stellte man fest, dass bei den Hydroxyaminosäuren und bei Tyrosin unter den angewendeten Bedingungen der Verlust bis zu 14% betragen kann. - Eine weitere Ursache für die kleinen Ungenauigkeiten ist in den angewendeten Reinigungsverfahren zu suchen. Die Säuberung des Peptides am Papier, die Sichtbarmachung und die Elution vom Papier mit verdünnter Essigsäure bringt Spuren von Kohlenhydraten und anderen organischen Bestandteilen zu dem hydrolisierenden Peptid. Die Fremdstoffe begünstigen zuweilen die teilweise Zerstörung gewisser Aminosäuren bei der Hydrolyse. Es wurde gefunden, dass der Verlust an Aminosäuren bei Säureeinwirkung proportional der zu eluierenden Papierfläche ist. Bei scharf wandernden Peptidbanden, d.h. bei dünnen Papierstreifen ist die Zerstörung der Aminosäuren durch Totalhydrolyse am geringsten.

Es wird jedoch festgestellt, dass sich die Befunde der Bausteinanalysen aller tryptischer Peptide einerseits und die Ergebnisse bei der Festsetzung ihrer Aminosäuresequenzen sowie die Resultate von der Peptidzuordnung andererseits in keinem Fall widersprechen. - Die Reinigungsverfahren am Papier sind demnach zur Strukturermittlung mit Erfolg anwendbar.

C. Die fällbaren tryptischen Peptide.

Durch quantitative Bausteinanalysen der löslichen tryptischen Peptide wurden zwei Drittel aller Aminosäuren von Human-Globin erfasst. Das letzte Drittel an Aminosäuren ist demnach im unlöslichen Anteil des tryptisch verdauten Proteins zu suchen.

Über die erste Untersuchung des isoelektrisch fällbaren Materials nach Trypsineinwirkung auf Hämoglobin berichtet INGRAM ²⁴. Der Niederschlag, der den grössten Teil der prosthetischen Gruppe des Moleküls enthält, wird vom Autor "Core" genannt. Die durchgeführten Versuche zeigen, dass das Präzipitat ein Gemisch von mindestens 6 Spaltprodukten ist. Ausser ungespaltenem Globinmaterial werden drei verschiedene Bruchstücke von unterschiedlicher Grösse gefunden. Die Analysenwerte der drei Peptide sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Durch die Heterogenität des Präzipitates wird der Ausdruck "Core" bedeutungslos. SCHROEDER ²⁵ schlägt deshalb die Bezeichnung "trypsin-resistente Fraktion" vor. Auch dieses Wort ist nicht sehr glücklich. Eines der drei Spaltprodukte (HT_β 13) ist ein einfaches tryptisches Peptid und enthält keine trypsinresistente Lysyl- bzw. Arginylbindung. Demzufolge wird auf eine "Sonderbezeichnung" verzichtet und die Peptide - in Anlehnung an die löslichen tryptischen Spaltprodukte - mit HT_α14 bzw. HT_β 13 und HT_β 14 benannt.

Tabelle 4 Die Analysenwerte der fällbaren tryptischen Peptide aus Human-Globin.

Pept.	Lys	His	Arg	CySO ₃ H	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Leu	Phe
HT _α 14	1,88	2,92	-	+	1,30	3,37	4,65	1,28	2,52	(0,40)	5,59	3,95	8,60	2,08
HT _β 13	0,99	1,96	-	0,82	1,13	-	-	-	-	2,06	1,19	2,97	3,73	0,95
HT _β 14	1,01	2,06	0,96	0,81	2,97	1,87	0,98	2,25	1,41	1,17	1,94	1,84	3,62	2,11

1.) Das unlösliche Peptid der α -Kette - HT α 14

Für das unlösliche Spaltprodukt wird eine Aminosäureanzahl von etwa 40 errechnet. Die Säuberung des Moleküls mit Eiweisscharakter (MG. 6000) von unverdauter Kette wird durch Adsorption am Papier erschwert.

Das Peptid HT α 14 besitzt als Baustein einen Cysteinrest. Die HS-Gruppen von zwei Resten werden ausserordentlich leicht - z.B. während der fermentativen Spaltung - zu -S-S-Brückenbindungen oxydiert. Aus monomeren entstehen dadurch dimere Moleküle, deren Adsorption am Papier wesentlich stärker ist. Eine Oxydation der -S-S-Brücken zu HO₃S-Gruppen zur Beseitigung der Doppelmoleküle ist wegen der Anwesenheit vieler Hydroxyaminosäuren (8-9 Reste) nicht angebracht ²⁷.

Weiterhin muss beachtet werden, dass die trypsinspezifische Bindung am N-terminalen Ende des unlöslichen Peptides bei kurzer Verdauungszeit vom Ferment nur teilweise gespalten wird. Bei der isoelektrischen Fällung erhält man daher auch ein ditryptisches Peptid, welches entfernt werden muss.

Die Hochspannungselektrophorese, die bei der Reinigung der löslichen Peptide zum Teil sehr gute Ergebnisse liefert, ist nicht anwendbar. Die Retention am Papier ist grösser als die Affinität des Peptides, im elektrischen Feld zu wandern. Die Ionenaustauschchromatographie mit Dowex 1/X2 und chromatographische Versuche mit den verschiedenen Lösungsmitteln ergeben keine Lösung des Problems.

Reinigung: Zur Beseitigung der Verunreinigungen wird der Niederschlag gelöst, nochmals mit Trypsin gespalten, zum zweiten Male gefällt und gewaschen.

HT α 14 - Lys 1, 88; His 2, 92; CySO₃H +; Asp 1, 30 Thr 3, 37;
Ser 4, 65; Glu 1, 28; Pro 2, 52; (Gly 0, 40); Ala 5, 59;
Val 3, 95; Leu 8, 60; Phe 2, 08;

Die ungenauen Analysenwerte zeigen, dass bei der Reinigung die Verunreinigungen nicht 100proz. beseitigt wurden. Am deutlichsten besagt dies der Glycinwert. Es wurden 0, 40 Molanteile als "Fremdaminosäure" bestimmt. Obwohl keine Oxydation mit Perameisensäure durchgeführt wurde, findet man 30% Cysteinsäure. Bei der Berechnung der Serin- und Threoninreste wurde eine 14- bzw. 6proz. Zerstörung durch Hydrolyse angenommen.

KONIGSBERGER und HILL ²⁸ teilen u. a. die Aminosäurezusammensetzung dieses Peptides mit. Die oben angeführte Analyse entspricht annähernd den angegebenen Werten der Autoren. Ausser Zweifel ist die von der amerikanischen Arbeitsgruppe verwendete Reinigungsmethode, die Gegenstromverteilung mit 500 Verteilungsschritten, einfacher als die nochmalige isoelektrische Fällung nach tryptischer Nachspaltung.

2.) Die unlöslichen Peptide HT β 13 und HT β 14.

Den ersten Hinweis für die Anwesenheit zweier Spaltprodukte im unlöslichen Anteil der mit Trypsin verdauten Kette bringt die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren mit Phenylthioisocyanat ²⁸. Man erhält die beiden Bausteine Leucin und Glycin. Am Aufbau beider Peptide sind etwa 40 Aminosäuren beteiligt. Da zu erwarten ist, dass die beiden Spaltprodukte nahezu gleich gross sind (jeweils 20 Bausteine), ist bei der Trennung und Säuberung mit geringeren Schwierigkeiten zu rechnen.

Beide Spaltprodukte besitzen Cysteinreste, so dass eine gegenseitige -S-S-Brückenvernetzung zu erwarten ist. Da nur wenige oxydationsempfindliche Aminosäuren gegenwärtig sind (2-3 Hydroxyaminosäuren), wird eine Oxydation mit Perameisensäure vorgenommen. Das ungespaltene Kettenmaterial und andere mitgefällte Bruchstücke werden durch eine tryptische Nachspaltung weitestgehend entfernt.

Fraktionierung. Für die präparative Trennung der beiden Peptide HT β 13 und HT β 14 wird das Dowex 1/X2-Verfahren angewendet. Die Fraktionierung der Spaltprodukte geschieht in der Regel zwischen pH 8,2 und 3,0. Die Unlöslichkeit der zu trennenden Peptide bei einem bestimmten pH schränkt den Auflösungsbereich erheblich ein. Um eine Ausfällung der Peptide auf der Säule zu verhindern, wird mit der Gradientenelution erst bei einem pH unterhalb ihres isoelektrischen Punktes begonnen. Da die Ausbeute an beiden Spaltprodukten äusserst gering ist, und von beiden Peptiden jeweils nur eine Analyse erhalten wurde, verwendet man als Ausgangsmaterial den unlöslichen Anteil von verdautem Globin. Bei gleicher Präparation (Oxydation; Nachspaltung) wird die Fraktionierung mit einer grösseren Menge und einer entsprechend stärkeren Chromatographiesäule reproduziert. Die erste Peptidfraktion erscheint abermals bei einem pH von 5,5; die zweite bei einem pH von 4,5. Die Analysen der Peptide entsprechen sich einander. Die Auftrennung der Peptide ist in Abb. 11 veranschaulicht.

Analysen.

HT β 13 - Lys 0,99; His 1,96; CySO₃H 0,82; Asp 1,13;
Gly 2,06; Ala 1,19; Val 2,97; Leu 3,73; Phe 0,95;

Reinigung: Isoamylalkoholsystem I, Rf-Wert: 0,4

Infolge der Behandlung mit Perameisensäure wird der Cysteinrest als Cysteinsäure bestimmt. Wegen des hohen Valingehaltes, dessen Peptidbindungen mit Salzsäure nur schwer gelöst werden, ist eine Analyse nach verlängerter Säureeinwirkung (40 h) notwendig. Die Werte bleiben unverändert. Die Endgruppenbestimmung von HT β 13 nach Edman ergibt die Aminosäure Leucin.

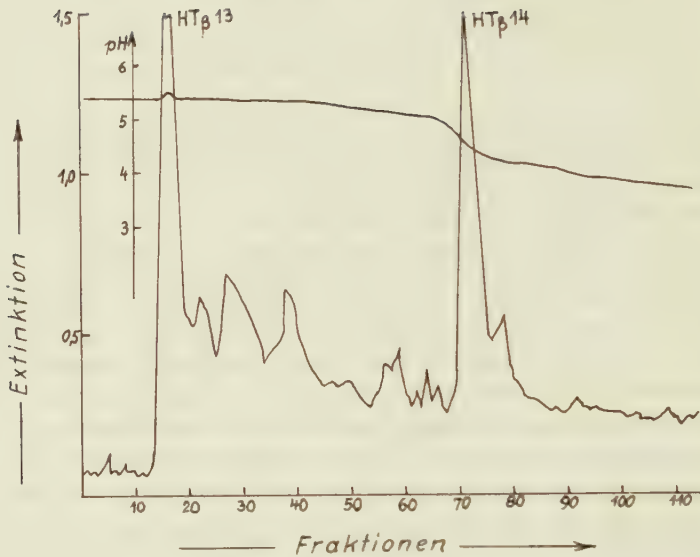


Abb. 11 Säulenchromatographische Analyse des unlöslichen Anteils vom tryptisch verdauten Globin.

Versuchsbedingungen: Dowex 1/X2, 200-400 mesh.

Säulengröße: 150 x 1,8 cm; Substanzmenge: 650 mg.

Gradient: 11 1% Pyr-Ac., pH 5,4 + 1n HAc.

Elutionsgeschwindigkeit: 33 ml/h.; Temp.: 35° C.

Volumen einer Fraktion: 10 ml.

Ausgezogene Kurve: Ninhydrinfarbe der Fraktionen nach alkalischer Hydrolyse.

HT β 14 ~ Lys 1,01; His 2,06; Arg 0,96; CySO₃H 0,81;
Asp 2,97; Thr 1,87; Ser 0,98; Glu 2,25; Pro 1,41;
Gly 1,17; Ala 1,94; Val 1,84; Leu 3,62; Phe 2,11;

Reinigung: Isoamylalkoholsystem IV, Rf-Wert: 0,90 oder
Isoamylalkoholsystem III, Rf-Wert: 0,40

Von dem Peptid wurden Analysen nach 20-, 40- und 70-stündiger Hydrolyse durchgeführt. Es zeigt sich, dass die Werte für Prolin, Alanin, Valin und Leucin nach 70-stündiger Säureeinwirkung grösser werden, die der übrigen Aminosäuren jedoch nahezu konstant bleiben. Offensichtlich besitzt dieses Peptid sehr säurestabile Bindungen, die die betreffenden Aminosäurereste (Pro, Ala, Val, Leu) zusammenhalten. Die Werte von Prolin und Leucin weichen auch nach 70-stündiger Hydrolyse erheblich von einem ganzzahligen Vielfachen ab. Es wird angenommen, dass die verlängerte Hydrolyse noch keine quantitative Lösung der Peptidbindungen bewirkt. Demzufolge werden die Werte bei der Erfassung der Aminosäureanzahl (Tabelle 6) nach oben aufgerundet.

Die angeführten Analysenwerte wurden nach 70-stündiger Totalhydrolyse des Peptides erhalten.

3.) Kritik.

Die negativen papierchromatographischen Versuche mit HT $_{\alpha}$ 14 (41 Bausteine) bestätigen den Befund, dass Spaltprodukte mit Eiweisscharakter am Papier nur selten mit Erfolg gereinigt werden können.

Da der Bausteinermittlung von den unlöslichen Peptiden der β -Kette, HT $_{\beta}$ 13 und HT $_{\beta}$ 14, eine Behandlung mit Perameisensäure vorauszog, können zerstörende Oxydationsreaktionen nicht ausgeschlossen werden. Die Analysenwerte aller Aminosäuren - auch von den Hydroxyaminosäuren - sind jedoch zufriedenstellend.

Die drei verschieden grossen, fällbaren Peptide (16 bis 41 Reste) unterscheiden sich von den löslichen dadurch, dass sie jeweils einen Cysteinrest als Baustein besitzen. Es wird angenommen, dass die HS-Gruppen der Spaltprodukte mit ihren vernetzenden Eigenschaften im gewissen Grade für die Unlöslichkeit der Peptide mit verantwortlich zu machen sind. Es wäre sonst nicht verständlich, warum die Neutralpeptide HT $_{\alpha}$ 9 und HT $_{\alpha}$ 11 mit ihren 16 bzw. 29 Bausteinen zu den löslichen Fraktionen gehören.

D. Schlussbetrachtung.

Durch die quantitative präparative Isolierung der α - und β -Kette und die Erfassung aller tryptischen Peptide aus den beiden Ketten wurde erstmals mit grösserer Genauigkeit die Aminosäurezahl von Human-Hämoglobin A ermittelt. In den Tabellen 5 und 6 sind die Zahlen der Aminosäurereste aller tryptischen Spaltprodukte der α - bzw. β -Kette wiedergegeben. Die Analysen ergeben insgesamt 292 Bausteine. Davon entfallen 142 auf die α - und 150 auf die β -Kette.

Zusammenfassung

Die Polypeptidketten (α - und β -Kette) des normalen adulten Human-Hämoglobins werden säulenchromatographisch getrennt und mit der Gegenstromverteilung gereinigt.

Durch selektive Spaltung der beiden Globinuntereinheiten wurde die Anzahl von sämtlichen tryptischen Spaltprodukten ermittelt. Von insgesamt 28 Peptiden gehören jeweils 14 zu der α - bzw. β -Kette.

Die löslichen tryptischen Peptide beider Ketten werden durch Säulenchromatographie mit Dowex 1/X2 fraktioniert, mit der Chromatographie oder Hochspannungselektrophorese auf dem Papier gereinigt und ihre Aminosäurezusammensetzungen sowohl qualitativ als auch quantitativ hinreichend charakterisiert.

Aus dem unlöslichen Anteil der tryptisch gespaltenen Ketten, der ein Drittel der Aminosäuren vom Globin enthält, werden die entsprechenden Peptide isoliert und ihre Aminosäuren quantitativ ermittelt.

Die Analysen von allen tryptischen Peptiden ergeben 292 Bausteine. Davon gehören 142 zur α - und 150 zur β -Kette. Die Analysenwerte stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Aminosäurebestimmungen von beiden Globinketten und widersprechen in keiner Weise den Studien der durchgeführten Aminosäuresequenzen. Sie sind eine Stütze für die weitere Ermittlung der Human-Globinstruktur.

Tabelle 5 Die Anzahl der Aminosäuren sämtlicher tryptischer Peptide der α -Kette.

Peptid Aminosäure	HT α 1	HT α 3	HT α 4	HT α 5	HT α 6	HT α 7	HT α 8	HT α 9	HT α 10	HT α 11	HT α 12	HT α 13	HT α 14	Sa.
Lysin	1	1	-	1	1	-	1	1	1	1	-	1	2	11
Histidin	-	1	-	-	-	-	-	2	-	3	1	-	3	10
Arginin	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	3
Asparaginsre.	-	-	-	1	-	-	-	1	1	6	-	2	1	12
Threonin	-	-	-	1	2	-	-	1	-	1	-	-	4	9
Serin	-	-	-	-	1	-	-	2	1	2	-	-	5	11
Glutaminsre.	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	3	-	1	5
Prolin	-	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	3	8
Glycin	-	2	-	-	-	-	1	1	-	-	3	-	-	7
Alanin	-	-	-	-	-	-	2	1	1	7	4	-	6	21
Cystein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Valin	-	-	-	1	-	-	-	1	1	3	1	2	4	13
Methionin	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	2
Leucin	-	-	1	-	1	-	-	1	1	4	1	-	9	18
Tyrosin	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	1	-	-	3
Phenylalanin	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	1	2	7
Tryptophan	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Summe	1	4	2	4	9	2	5	16	7	29	15	7	41	142

Tabelle 6 Die Anzahl der Aminosäuren sämtlicher tryptischer Peptide der β -Kette.

Peptid Aminosäure	HT β 1	HT β 2	HT β 3	HT β 4	HT β 5	HT β 6	HT β 7	HT β 8	HT β 9	HT β 10	HT β 11	HT β 12	HT β 13	HT β 14	Sa.
Lysin	1	1	1	1	1	-	1	-	1	1	-	1	1	1	11
Histidin	-	1	-	1	-	-	-	1	1	1	-	-	2	2	9
Arginin	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	1	3
Asparaginsäure.	-	-	-	1	-	-	-	-	-	3	2	3	1	3	13
Threonin	-	-	-	-	1	1	1	-	1	-	-	1	-	2	7
Serin	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	2	-	1	5
Glutaminsäure.	-	-	-	-	-	1	3	-	2	-	2	1	-	2	11
Prolin	-	-	-	-	-	1	2	-	1	-	-	2	-	2	8
Glycin	-	1	-	1	1	-	-	-	-	2	3	2	2	1	13
Alanin	-	1	-	4	2	-	2	-	-	2	1	1	1	2	16
Cystein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2
Valin	-	-	1	3	1	2	1	-	1	1	3	1	3	2	19
Methionin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Leucin	-	-	-	1	1	2	-	-	1	4	1	1	4	4	19
Tyrosin	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	3
Phenylalanin	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	3	1	2	8
Tryptophan	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Summe	1	4	2	12	9	10	12	2	8	16	13	19	16	26	150

Experimenteller Teil

A. Versuche zur Gewinnung reiner Polypeptidketten.

1.) Die Säulenchromatographie.

Die Bereitung des Harzes. $\frac{1}{2}$ Ltr. des Kationenaustauschers IRC-50 wird in 3-5 Ltr. Wasser suspendiert. Nach viertelstündiger Sedimentationszeit wird das feine Material im Überstand entfernt. Der Vorgang wird solange wiederholt, bis nach 15 min Absetzzeit im Überstand der feine Staub verschwunden ist. Danach wäscht man den Austauscher auf einer Glasfritte bei Zimmertemperatur mit 2 Ltr. 3n HCl und anschliessend mit Wasser. Nun wird das Harz mit 2, 5n Natronlauge behandelt. Schliesslich wird das neutral gewaschene Austauscherharz mit 3n HCl wieder in die H^+ -Form übergeführt und die Säure mit entionisiertem Wasser entfernt.

Das Beschicken der Säule. Die wässrige Suspension des Austauschers IRC-50 (H^+ -Form) wird mit Wasserstrahlvakuum entlüftet und auf eine Säule (1,9 x 55 cm) gegeben. Die mit Harz beschickte Säule wird 1-2 Stunden mit 3n Ameisensäure äquilibriert. Das Globin (400-450 mg) wird in 35 ml Ameisensäure gelöst und mit 10g trockenem Harz IRC-50 kräftig geschüttelt. Dann wird diese Suspension auf die Säule gebracht.

Die Elution. Die mit Globin beschickte Säule wird anschliessend mit 2m Harnstofflösung 12-15 h klimatisiert. Die Durchflussgeschwindigkeit beträgt 25-30 ml/h. Danach wird ein Gradient angeschlossen,

Die Bereitung eines Gradienten.

In dem Behälter (I) befindet sich die Pufferlösung A und zur Durchmischung der Flüssigkeit ein Magnetrührer. Man verschliesst den Behälter (Saugflasche) mit einem festsitzenden Gummistopfen luftdicht ab. Durch den durchbohrten Verschluss führt ein Ein- und Ausflussrohr bis in die Nähe des Bodens. Ein Polyäthylenschlauch verbindet das Einflussrohr des Behälters (I) mit dem Behälter (II) und der Lösung B. Das Ausflussrohr des Behälters (I) wird mittels eines Polyäthylenschlauches an die Säule angeschlossen. In dem Masse die Elutionsflüssigkeit aus (I) auf die Säule fliesst, strömt aus Behälter (II) die Lösung B in den Behälter (I).

Die Lösung A in (I) besteht aus 2 Ltr. 2m Harnstoff mit 20% Essigsäure. Das pH der Lösung wird mit konz. HCl auf pH 1,9 eingestellt.

Die Lösung B in (II) enthält 8m Harnstoff mit 20% Essigsäure. Das pH der Lösung ist ebenfalls 1,9. Die Elution findet bei Zimmertemperatur statt.

Die Identifizierung der Komponenten. Das Eluat sammelt man in 20 ml Fraktionen. Durch Messen der einzelnen Fraktionslösungen im UV bei 280 m μ und Aufzeichnen ihrer Extinktionswerte erhält man das Säulenchromatogramm in Abb. 2. Die Flüssigkeitsmengen der Fraktionen eines Extinktionsgipfels werden vereinigt. Eine Dialyse der Lösungen entfernt den grössten Teil des Harnstoffes. Dann wird das

Flüssigkeitsvolumen im Rotationsverdampfer eingeengt und nochmals dialysiert. Nach dem Gefriertrocknen der Lösungen beider Extinktionsgipfel erhält man 100-150 mg von Komponente I und 120-200 mg von Komponente II.

Die Rechromatographie der Ketten. Die Menge der beiden Komponenten I und II aus zwei säulenchromatographischen Versuchen werden für sich nochmals über eine IRC-50-Säule gereinigt. Die Versuchsbedingungen werden beibehalten.

2.) Die Gegenstromverteilung.

Das binäre System für die Reinigung sowohl der α - wie der β -Kette durch Gegenstromverteilung besteht aus 25 ml mit Butanol(2) gesättigter 1% DCA (Unterphase) und 30 ml mit 1% DCA gesättigtes Butanol(2) (Oberphase) für ein Element. Während der Gegenstromverteilung ist eine Phasenänderung auszuschliessen. Alle Versuche werden daher bei konstanter Temperatur vorgenommen (20° C).

Man bereitet sich für 100 Verteilungselemente die beiden Lösungsmittel. Dann werden 1, 0-1, 5 g einer Kette (α oder β) in 50 ml 0, 1% DCA gelöst und 12-14 h gegen 1% DCA dialysiert. Anschliessend wird die Lösung mit Flüssigkeit der Unterphase auf 150 ml aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen an Lösungsmittel der oberen Phase kräftig geschüttelt. Die entstehende Emulsion wird in 5 Verteilungsröhrchen (Nr. 3-7) gebracht. Die Elemente Nr. 1-2 und Nr. 8-17 werden mit Unter- und Oberphase beschickt. Es sind die sogenannten "Vor- und Nachläufer", und dienen zur Klimatisierung der Apparatur. Alle übrigen Röhrchen werden mit je 25 ml Lösungsmittel der Unterphase versehen. Dann beginnt man mit der Gegenstromverteilung. Es werden pro Verteilungsschritt 30 ml Oberphase automatisch hinzugegeben. Der Versuch über 98 Verteilungselemente dauert 30 h. Danach werden die Fraktionen mit jeweils 4 ml Äthanol versetzt, wodurch die beiden Phasen zum Verschwinden gebracht werden. Die Bestimmung der Eiweisskomponente erfolgt durch Messen der Fraktionen im UV-Licht bei 280 m μ . Beim Aufzeichnen der Extinktionswerte erhält man für die α - bzw. β -Kette die Gegenstromverteilungsdiagramme in den Abb. 4 und 5. Die entsprechenden proteinhaltigen Lösungen werden vereinigt, und mit 4n Natriumacetatpuffer (pH 5, 5) neutralisiert. Den grössten Teil des organischen Lösungsmittels entfernt man im Rotationsverdampfer. Danach wird 24 h gegen 0, 1n Essigsäure dialysiert. Zur vollständigen Entfernung der Salze wird die Proteinlösung jeweils auf etwa 200 ml eingeengt und nochmals 24 h gegen 0, 1n Essigsäure dialysiert. Durch anschliessendes Gefriertrocknen erhält man ein schneeweisses Kettenmaterial.

Die Ausbeute an α - und β -Kette beträgt jeweils 50%.

Die Elementaranalyse der β -Kette ergibt

Cl₂ = 7, 05%; dies entspricht 13, 8% DCA

N₂ = 12, 6 %; bei Abzug der 13, 8% DCA erhält man 14, 5% N

S = 1, 30%.

B. Versuche zur Fraktionierung von Peptiden.

1.) Darstellung der Peptide.

Die Denaturierung des Kettenmaterials. Etwa 400 mg einer Kette (α oder β) werden in 50 ml 8m Harnstofflösung gelöst und 45 min bei 60° C incubiert. Anschliessend dialysiert man den Harnstoff aus der Proteinlösung. Bei etwa 16-stündiger Dialyse-dauer wird die Lösung durch Präzipitation des Eiweisses getrübt.

Die fermentative Spaltung. Für die tryptische Spaltung einer Polypeptidkette werden die Versuchsbedingungen von LIEBOLD¹⁶ modifiziert. Die feindisperse Suspension des Proteins nach der Denaturierung wird in die Verdauungszelle eines Autotitrators gebracht. Durch Zugabe von Lauge wird ein pH von 7,0 eingestellt. Es fällt weiteres Protein feindispers aus. Das zur Verdauung benötigte Trypsin (krist. von C.F. Boehringer und Soehne) wird 16 h lang bei 36,5° C mit n/16 HCl behandelt, wodurch geringe Mengen von Fremdproteasen (Chymotrypsin) inaktiviert werden. Die Enzymlösung (4 mg Trysin) wird bei pH 7,0 zur feindispersen Suspension der Polypeptidkette hinzugegeben. Die bei der fermentativen Spaltung freiwerdenden H^+ -Ionen werden mit 1n NaOH titriert. Nachdem 1 h bei pH 7,0 mit Trypsin gespalten wurde, bringt man die Proteinsuspension auf pH 8,0. Nach 5 h wird die Verdauung unterbrochen. Nach dieser Zeit ist der Niederschlag nahezu vollständig verschwunden.

Die Abtrennung der isoelektrisch fällbaren Peptide. Das Volumen der mit Trypsin verdauten Lösung bringt man im Rotationsverdampfer auf 25-30 ml und zentrifugiert vom unlöslichen Material ab. Dann wird mit verdünnter Essigsäure langsam angesäuert. Bei pH 7,0-7,2 trübt sich die Lösung, bei pH 6,4-6,2 flockt ein Teil des tryptischen Hydrolysates aus. Der unlösliche Anteil wird hochtourig abzentrifugiert und 2 x mit je 10 ml 1% Pyridinacetat (pH = 6,3) gewaschen. Das abgetrennte unlösliche Peptid löst man in verdünnter Essigsäure und lyophilisiert. Man erhält ein weisses Produkt. Die Ausbeute beträgt 50-80 mg.

2.) Die Säulenchromatographie.

Die Bereitung des Austauschers. Das von feinen Teilchen befreite Harz Dowex 1/X2, 200-400 mesh wird in die Acetatform übergeführt. Man bringt das feuchte Austauschmaterial auf eine grosse Glasfritte und gibt Eisessig im Überschuss bei (Volumenanteil 3:1). Dann verrührt man die Suspension und saugt nach 15 min die Säure ab. Nach dem Neutralwaschen mit dest. Wasser ist das Harz von eingeschlossenen Gasen zu befreien. Man bringt den Austauscher in eine Saugflasche und gibt destilliertes Wasser hinzu. Das Volumenverhältnis von Harzablagerung zu Überstand beträgt 1:1. Danach wird solange Wasserstrahlvakuum angelegt, bis aus der aufgeschüttelten Harzmasse keine Gasblasen entsteigen (5-6 h).

Das Beschicken der Säule. In den Chromatographiesäulen befinden sich am Boden der Zylinder weitporige Fritten (G_2). Jede Säule wird von einem Mantel umgeben, so dass eine Temperatureinstellung mit Wasser aus einem Ultrathermostaten möglich ist. Das Volumen der Säule hängt von der Menge des aufzutrennenden Gemisches ab. Vor dem Beschicken der Säule wird die Wasserzirkulation angeschlossen. Sobald die gewünschte Wassertemperatur erreicht ist ($35^{\circ}C$), kann mit dem Bau der Säule begonnen werden. Die Säule wird mit der entgasten Harzsuspension gefüllt. Mit dem Absinken des Flüssigkeitspegels wird weiteres aufgeschlämmtes Harz dazugegossen. Die Packung der Partikelchen soll uniform geschehen. In der unteren Säulenhälfte geschieht dies von selbst, da das über dem Sediment befindliche Suspensionsvolumen genügend gross ist. Beim Packen der oberen Hälfte wird vor dem Zugiessen der Suspension die verdünntere Aufschlämmung abpipettiert.

Die Elution. Die frisch gebaute Säule wird mit einem Gummistopfen, durch den ein Glasröhrchen führt, verschlossen. Ein angeschlossener Polyäthylenschlauch leitet die Elutionslösung auf die Säule. Der Flüssigkeitspegel soll 3-5 cm über der Harzsäule stehen. Man äquilibriert die Ionenaustauschsäule mit der gewünschten Pufferlösung. Zur Änderung der Elutionsgeschwindigkeit bedient man sich des hydrostatischen Druckes. Stellt man das Elutionsgefäss weit über der Säule auf, ist die Durchflussgeschwindigkeit gross. Das Peptidgemisch kann aufgetragen werden, wenn das pH der in die Säule einfliessenden Lösung gleich dem pH der ausfliessenden ist (15-20 h). Das zu trennende Gemisch besitzt beim Auftragen einen grösseren pH als die Äquibrierflüssigkeit. Das Kohlendioxyd und die Luft werden im Rotationsverdampfer beseitigt. Das Aufbringen auf die Säule ist vorsichtig auszuführen, so dass die Säulenpackung an der Oberfläche nicht verändert wird (kein Aufwirbeln der Harzpartikel). Sofort nach dem Auftragen wird die Elutionsflüssigkeit mit dem Fraktionsschneider aufgefangen.

Versuchsbedingungen:

a. Zur Trennung von 400 mg tryptisch gespaltener Kette (α oder β)
Säulengrösse: 1,8 x 150 cm.

Äquibrierflüssigkeit: Ac-lösung von pH 8,2 mit 1% Coll.

Aufzutragendes Peptidgemisch: 40 ml von pH 8,85 mit 1% Coll.

Vol. einer Fraktion: 10 ml. Elutionsgeschwindigkeit: 33 ml/h.

Elution von Fraktion 1-70: Ac-lösung von pH 8,2 mit 1% Coll.

Von Fraktion 70-180: 1. Gradient. Pufferlösung A:

1 Ltr. Ac-lösung von pH 7,5 mit 1% Pyr. u. 1% Coll.

Pufferlösung B: 2 Ltr. 0,1n Essigsäure.

Von Fraktion 180-300: 2. Gradient. Ersatz der Pufferlösung B
des 1. Gradienten durch 2 Ltr. 2n Essigsäure.

b. Zur Trennung von 200 mg tryptisch verdauter Kette (α oder β)

Säulengrösse: 0,9 x 150 cm.

Äquilibrierflüssigkeit: Ac-lösung von pH 8, 2 mit 1% Coll.

Aufzutragendes Peptidgemisch: 20 ml mit 1% Coll. pH 8, 85.

Vol einer Fraktion: 5 ml. Elutionsgeschwindigkeit: 17 ml/h.

Elution von Fraktion 1-70: Ac-lösung von pH 8, 2 mit 1% Coll.

Von Fraktion 70-180: 1. Gradient. Pufferlösung A:

$\frac{1}{2}$ Ltr. Ac-lösung von pH 7, 5 mit 1% Pyr. und 1% Coll.

Pufferlösung B: 1 Ltr. 0, 1n Essigsäure

Von Fraktion 180 bis 300: 2. Gradient. Ersatz der Pufferlösung B

des 1. Gradienten durch 1 Ltr. 2n Essigsäure.

c. Zur Trennung der unlöslichen tryptischen Peptide der β -Kette: 80 mg.

Säulengrösse: 0,9 x 150 cm

Äquilibrierflüssigkeit: Ac-lösung von pH 5, 4 mit 1% Pyr.

Aufzutragendes Peptidgemisch: 20 ml von pH 8, 0 mit 1% Coll.

Vol. einer Fraktion: 5 ml. Elutionsgeschwindigkeit: 17 ml/h.

Gradientenelution von Fraktion 1-150: Pufferlösung A:

$\frac{1}{2}$ Ltr. Ac-lösung von pH 5, 4 mit 1% Pyr. Pufferlösung B:

1 Ltr. 1n Essigsäure.

d. Zur Trennung der unlöslichen tryptischen Peptide von Globin: 650 mg.

Säulengrösse: 1,8 x 150 cm

Äquilibrierflüssigkeit: Ac-lösung von pH 5, 4 mit 1% Pyr.

Aufzutragendes Peptidgemisch: 50 ml von pH 8, 0 mit 1% Coll.

Vol. einer Fraktion: 10 ml. Elutionsgeschwindigkeit: 33 ml/h.

Gradientenelution von Fraktion 1-150: Pufferlösung A:

1 Ltr. Ac-lösung von pH 5, 4 mit 1% Pyr. Pufferlösung B:

2 Ltr. 1n Essigsäure.

Die Peptidbestimmung. Zur Ermittlung der Peptide dient die colorimetrische Messung der blauen Ninhydrinfarbe von Aminosäuren nach STEIN und MOORE. Die Ninhydrinstandardlösung besteht aus 3,0 g Ninhydrin und 1,0 g-Hydrindantin, die man in einer braunen Flasche in 375 ml Methyl-collosolve (Monomethylglykoläther) unter Stickstoff löst. Dann fügt man 125 ml 4n Natriumacetat pH 5, 5 hinzu und lässt weitere 10 min Stickstoff durch die Lösung perlen. Die Flasche wird luftdicht abgeschlossen.

Bei Reihenmessungen werden die Lösungen zweckmässig und genau mit einer Pipettiermaschine beigegeben. Für die Identifizierung der Peptide entnimmt man den Fraktionen jeweils 0,3 ml und hydrolysiert die Proben mit je 1 ml 2,5n NaOH 2,5 h bei 90 ° C. Anschliessend neutralisiert man die alkalischen Lösungen mit

1 ml 30proz. Essigsäure pro Fraktion. Dann wird zu den Testproben jeweils 1 ml Ninhydrinstandardlösung beigegeben. Die Farbausbeute ist nach 15-min-Reaktion bei 100° C optimal. Zur Extinktionsmessung verdünnt man die Farblösungen mit je 6 ml Äthanol/Wasser (1:1). Die Extinktionswerte werden bei 570 m μ bestimmt. Für das Extinktionsdiagramm einer säulenchromatographischen Analyse von tryptischen Peptiden trägt man die Werte auf die Ordinate, die Zahl der Fraktionen auf die Abszisse eines Koordinatensystems ein (siehe Abb. 7, 8 und 11).

Alle zu einem Extinktionsgipfel gehörenden Fraktionen werden im Rundkolben vereinigt und im Rotationsverdampfer mit Wasserstrahlvakuum zur Trockene gebracht. Bei den Versuchsbedingungen unter a. und d. werden die getrockneten Fraktionsrückstände in 3 ml Wasser gelöst und quantitativ in Reagensgläser übergeführt. Bei den Versuchsbedingungen unter b. und c. werden die zur Trockene gebrachten Fraktionen in 1,5 ml Wasser aufgenommen und in Reagensgläser gegeben. Man bewahrt die "Stammlösungen" der Peptidfraktionen bei tiefen Temperaturen auf (-20° C).

C. Allgemeine Methoden zur Untersuchung von Peptidfraktionen.

1.) Die Oxydation mit Perameisensäure.

Die Oxydation eines Peptides dient der Überführung seiner Cystein- bzw. Cystinreste in Cysteinsäurereste. Man bringt 10-100 μ mol des Spaltproduktes auf eine Temperatur von -5° C. Zur Bereitung von Perameisensäure werden 9,5 ml Ameisensäure (99%) mit 0,5 ml 30% H₂O₂ vereinigt und 90 min bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wird die Säure auf -5° C abgekühlt, das zu oxydierende Produkt hinzugegeben und 3 h bei -5° C stehengelassen. Die Reaktionslösung wird anschliessend mit Eiswasser um das 10fache ihres Volumens verdünnt und im Rotationsverdampfer bis auf etwa 4 ml eingengt. Zur restlosen Entfernung der überschüssigen Säure wird mit Eiswasser auf 100 ml aufgefüllt und nochmals im Rotationsverdampfer eingengt. Zum Aufbewahren bei tiefen Temperaturen wird die Lösung lyophilisiert.

2.) Reinigungsverfahren.

Papierchromatographie. Bei Anwendung der Verteilungschromatographie am Papier wird die Substanz punktförmig auf Schleicher-Schüll-Papier 2043b aufgetragen. Man tüpfelt pro Fleck 0,025 ml (0,1 μ mol) von der Stammlösung einer Peptidfraktion.

Das System für absteigende Chromatographie:

Partridge-System: Oberphase von n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:5 = BEW.

Laufzeit: 20-50 h.

Die Systeme für aufsteigende Chromatographie:

Isoamylalkoholsystem	I:	Isoamylalkohol/Pyridin/Wasser/Ameisensäure = 40:40:20:0,6.
Isoamylalkoholsystem	II:	Isoamylalkohol/Pyridin/0,1n NH ₃ = 1:1:1.
Isoamylalkoholsystem	III:	Isoamylalkohol/Pyridin/Wasser = 40:60:20.
Isoamylalkoholsystem	IV:	tert.-Amylalkohol/28% Pyridin/Ameisensäure = 60:25:20.
Pyridinsystem	I:	Pyridin/Ameisensäure/0,1n NH ₃ = 1:1:1
Laufzeit: 15-20 h.		

Hochspannungselektrophorese. Für die Elektrophorese dient die in der Diplomarbeit beschriebene Versuchsanordnung⁶. Die zu untersuchende Substanz wird auf einen Papierstreifen (Schleicher-Schüll 2043b; 14-40 cm breit) aufgetragen. Die Startlinie richtet sich nach der Ladung der Spaltprodukte. Ein Tuluolbad sorgt während der Pherographie für die Kühlung. Es wird mit einem Spannungsabfall von 100 V/cm gearbeitet. Anschliessend wird der Papierstreifen mit dem zur Anwendung kommenden Elektrolyten besprüht. Versuchsdauer: 50-120 min. Als Elektrolyte kommen folgende Pufferlösungen zur Anwendung.

1. Pyr-Acetat; pH = 6,3 - 5 % Pyridin, 0,2% Eisessig
2. Pyr-Acetat; pH = 3,6 - 0,4% Pyridin, 3 % Eisessig

3.) Sprühreaktionen.

Zur Ermittlung sämtlicher Aminosäuren und Peptide wählt man die Ninhydrinreaktion mit 0,1proz. Lösung.

Ein Gramm Ninhydrin werden in 1 Ltr. n-Butanol unter Zusatz von 40 ml 2,4,6-Collidin und 300 ml Eisessig gelöst. Man besprüht das bei 60-100° C getrocknete Chromatogramm mit der Lösung. Die Aminosäuren und Peptide werden nach einer Entwicklungszeit von etwa 3 min bei 100° C auf dem Papier als blaue Flecken von unterschiedlicher Tönung sichtbar. Die Aminosäure Prolin ist gelb gefärbt.

Zum Nachweis eines Peptides, das weiter untersucht werden soll, bedient man sich der Reaktion mit 0,02proz. Ninhydrinlösung.

Zu 200 mg Ninhydrin werden 150 ml Wasser gegeben und mit n-Butanol auf 1 Ltr. aufgefüllt. Nach dem Besprühen ist eine längere Entwicklungszeit (10-15 min) bei 100° C vonnöten.

Für das Erkennen von arginylhaltigen Peptiden wird das Sakaguchi-Reagens verwendet. Es wird mit einer 0,1proz. 8-Hydroxychinolinlösung in Aceton besprüht. Nach dem Trocknen wird mit 0,2 ml Brom in 100 ml 0,5n NaOH entwickelt. Es erscheinen augenblicklich rote Flecken.

Tyrosylhaltige Peptide zeigen eine rotviolette Farbe, wenn man das Chromatogramm mit 0,1proz. alkoholischer α -Nitroso- β -naphtollösung besprüht, bei Zimmertemperatur trocknen lässt und dann mit 10proz. HNO_3 besprüht. Die Flecken erscheinen nach kurzem Erhitzen (5 min) bei 100°C .

Der spezifische Nachweis histidylhaltiger Peptide benötigt eine 1proz. Lösung von p-Anisidin in Äthanol, die mit 1,9 ml 6n HCl /100 ml versetzt wird. Bei Gebrauch wird mit 10proz. Amylnitritlösung in Äthanol 1:1 gemischt und nach 3 min zum Besprühen verwendet. Man lässt bei 20°C trocknen und entwickelt mit 1proz. alkoholischer KOH . Die entsprechenden Peptide ergeben rotbraune Flecken.

Zum Tryptophanyl-Nachweis besprüht man mit 1proz. p-Dimethylaminobenzaldehydlösung in Aceton und entwickelt bei 60°C .

4.) Die Elution. Die am Papier getrennten und gereinigten Peptide - mit 0,02proz. Ninhydrinlösung sichtbar gemacht - werden je nach Art und Grösse des Peptides mit 5-, 10- und 30proz. Essigsäure eluiert. Dazu werden die peptidhaltigen Papierstreifen im Chromatogramm ausgeschnitten und absteigend chromatographiert. Auf einer Glasplatte befindet sich je nach Länge der Papierstreifen ein entsprechend grosser Aufbau. Darauf steht eine Petrischale mit der Elutionsflüssigkeit. Eine etwa gleich breite Fahne vermittelt den Übertritt der Elutionsflüssigkeit aus der Petrischale auf den peptidhaltigen Papierstreifen. Das untere Ende des Elutionsstreifens wird pfeilartig zugeschnitten. Seine Spitze zeigt in ein Erlmayerkölbchen, in dem das Eluat gesammelt wird. Ein mit verdünnter Essigsäure befeuchteter zylindrischer Behälter wird über die Elutionsvorrichtung gestülpt. Somit ist für Sättigung des Raumes mit beweglicher Phase gesorgt.

5.) Die Totalhydrolyse.

Die peptidhaltigen Eluate werden mit einem Tropfen verdünnter HCl versetzt und im Exsiccator über CaCl_2 und KOH mit Wasserstrahlvakuum zur Trockene gebracht. Dann wird die Substanz mit 2 ml 5,7n HCl (2 x dest.) quantitativ in Reagensgläser übergeführt, die in der Mitte durch Ausziehen in der Bunsenbrennerflamme verjüngt wurden. Danach leitet man 10 min lang - mittels einer Kapillare - sauerstofffreien Stickstoff in die salzsaure Lösung. Sofort nach dem Einleiten schmilzt man das Reagensglas ab. Die Dauer der Hydrolyse bei 110°C beträgt 20 bis 70 h.

6.) Die analytischen Verfahren.

Qualitative Analyse. Die Salzsäure der hydrolysierten Lösung wird im Rotationsverdampfer entfernt und der Aminosäurerückstand in 0,1 ml Wasser gelöst. Die qualitativen Aminosäurezusammensetzungen der grossen Peptide stellt man mit einem zweidimensionalen Chromatogramm fest, die der Di- und Tripeptide mit einem eindimensionalen. In der 1. Richtung lässt man das Aminosäuregemisch absteigend in

BEW laufen. Die Versuchszeit ist etwa 20 h. Nach dem Trocknen wird für die 2. Dimension Phenol/Boratpuffer 80:20 pH 8,3 verwendet. Die Laufzeit beträgt dabei 15-18 h. - Für das eindimensionale Chromatogramm nimmt man Schleier-Schüll-Papier 2043b, für das zweidimensionale eignet sich Whatman Nr. 1. Die Aminosäuren auf den Chromatogrammen werden mit dem Ninhydrinsprühtest sichtbar gemacht.

Quantitative Analyse. Für die quantitative Bestimmung der Aminosäuren eines Peptides bzw. eines Proteins wird der Rückstand nach der Entfernung von Salzsäure in einer bestimmten Menge (1,7 ml) 0,2n Natriumcitratpuffer pH 2,2 gelöst. Die Proben werden mittels Ionenaustauschchromatographie und einem automatischen Registriergerät von SPACKMAN et al.,¹⁴ analysiert.

Die Ausbeuten. Bei der Trypsineinwirkung auf eine Polypeptidkette (α oder β) erhält man eine Spaltungsausbeute von 60%. Stellt man die 13,8% DCA in Rechnung, erhält man aus 400 mg Kette als Ausgangsmaterial von jedem tryptischen Peptid effektiv 12 μmol .

Für eine quantitative Analyse eines Peptides benötigt man im Durchschnitt zur Reinigung am Papier 15 x 0,025 ml von 3 ml Stammlösung. Dies entspricht etwa 1,5 μmol . Nach der Hydrolyse werden $\frac{1}{3}$ der Menge zur Bestimmung der basischen und $\frac{2}{3}$ für die sauren und neutralen Aminosäuren gebraucht. - Bei den Analysen der Ketten sowie beim Peptid HT α 14 werden Korrekturen für die Zerstörung von Serin und Threonin während der Hydrolyse vorgenommen. Aus der Berechnung der Lysin- bzw. Argininwerte, der kleinsten vorhandenen Vielfache bei tryptischen Peptiden, wird eine Ausbeute an einzelnen Peptiden von 20-70% festgestellt.

7.) Endgruppenbestimmungen.

Edman-Abbau. Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren der Peptide HT β 13 + HT β 14 wird die Methode von Sjöquist²⁸ in abgeänderter Form angewendet. Die trockene Substanz (1,0 μmol) wird in 0,6 ml Puffer pH 10,1 gelöst und 0,6 ml Phenylthioisocyanat in Aceton hinzugegeben. Nach dem Durchmischen wird die Lösung 2 h bei 40°C incubiert. Dann werden einige Tropfen Eisessig hinzugefügt. Das Aceton entfernt man vorsichtig im Rotationsverdampfer. Die Thio-carbamylderivate der beiden Peptide fallen dabei aus. Die wässrige Suspension wird mit 5 x 0,5 ml Benzol:Äthylenchlorid (7:3), das mit n/10 NaOH gesättigt ist, extrahiert und anschließend im Vakuum getrocknet. Die Anlagerung von Phenylthioisocyanat wird einmal wiederholt.

Die Cyclisierung der Phenylthiocarbamylderivate zu den Phenylthiohydantoinen wird in 0,5n HCl durchgeführt. Das getrocknete Reaktionsprodukt suspendiert man in 1 ml Wasser und gibt 1 ml n HCl + 1 Tr. Eisessig hinzu. Die Reaktion verläuft über 2 h bei 40°C. Die freiwerdenden Phenylthiohydantoinen werden mit 3 x 1 ml der organischen Phase von Essigester Äthylenchlorid (15:5), das mit gleichen Teilen Wasser gesättigt ist, extrahiert. Die vereinigten Extrakte trocknet man im

Vakuum (Rotationsverdampfer) und löst sie wieder in 0,2 ml 90proz. Essigsäure. Für ein aufsteigendes Papierchromatogramm tüpfelt man 0,01-0,02 ml der Thiohydantionlösung. Das Lösungsmittel der Chromatographie richtet sich nach dem zu bestimmenden Aminosäurederivat. Es werden folgende Lösungsmittelsysteme verwendet.

1. 70 ml Heptan : 30 ml Pyridin.

2. Obere Phase von 40 ml Heptan, 20 ml n-Butanol, 40 ml Ameisensäure.

3. 40 ml Heptan, 40 ml n-Butanol, 20 ml Ameisensäure.

Die Chromatogramme werden zunächst 12-15 h klimatisiert. Die Laufzeit auf Whatman-Papier Nr. 1 beträgt 5-6 h. Zum Erkennen der farblosen Aminosäurederivate besprüht man das an der Luft getrocknete Chromatogramm mit 1proz. Stärkelösung und trocknet bei 50-60° C. Die Phenylthiohydantoinkomponenten erscheinen beim Besprühen mit der Entwicklungslösung (0,01m J₂ in 0,5m KJ und 0,5m NaN₃ = 1:1) als gebleichte Flecken auf rotvioletten Hintergrund. Alle notwendigen organischen Lösungsmittel werden durch Redestillation gereinigt.

Abbau mit Carboxypeptidase. Man verwendet eine wässrige Suspension (12,1 mg/ml) der Carboxypeptidase A (5 x krist.). Es werden 0,01 ml Suspension entnommen und in 0,29 ml einer 10proz. LiCl-Lösung gebracht. Für 1 µmol Peptid entnimmt man der Enzymlösung 50-70 µl = 0,15 ml. In einer Mikrobürette werden 0,01n NaOH hinzugegeben, bis die Lösung einen pH von 7,5 aufweist. - Die wässrige Peptidlösung bringt man ebenfalls auf pH 7,5 und gibt die Enzymlösung bei. Man hydrolysiert bis zu 5 h bei Zimmertemperatur. In bestimmten Zeitintervallen entnimmt man $\frac{1}{5}$ des Hydrolysates und bringt es in 0,5 ml 0,1n HCl. Die fermentative Spaltung wird somit unterbrochen. Die Identifizierung der abgespaltenen Aminosäuren erfolgt durch eindimensionale Papierchromatographie im Partridge-system.

DNP-Methode. Die Umsetzung der β -Kette mit Fluordinitrobenzol geschieht nach der Vorschrift, die in der Diplomarbeit ⁶ angegeben ist. Es werden 15 mg (etwa 1 µmol) eingesetzt. Nach der Reaktion wird das isolierte Dinitrophenylderivat nur teilweise hydrolysiert. Es wird mit 2-3 ml 12n HCl 18 h lang bei 37° C behandelt. Man schüttelt die verdünnte, salzsaure Lösung mit Äther aus und chromatographiert den Auszug im Toluolsystem von LEVY ²⁹. Es ergibt sich nur ein ätherlösliches DNP-Spaltprodukt mit einem R_f-Wert, der dem des DNP-Leucins entspricht. Das Produkt wird vom Papier mit Wasser ausgewaschen, getrocknet und der Totalhydrolyse mit 6n HCl unterworfen. Durch eindimensionale Chromatographie (Toluolsystem) erhält man das Ergebnis.

Literaturverzeichnis

- 1) F. Sanger u. E.O.P. Thompson, Biochem. J. 53, 353 (1953)
- 2) D.H. Spackman, S. Moore u. W.H. Stein, Federation Proc. 16, 252 (1957)
- 3) T. Svedberg u. R. Fahraeus, J. Amer. chem. Soc. 48, 430, (1926)
- 4) M.E. Perutz, M.G. Rossmann, A.F. Cullis, M. Murhead u. G. Will, Nature (London) 185, 416 (1960)
- 5) G. Braunitzer, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 312, 72, (1958)
- 6) K. Hilse, Diplomarbeit, München (1959)
- 7) V. Rudloff, Diplomarbeit München (1959)
- 8) S. Wilson u. D.B. Smith, Canad. J. Biochem. Physiol. 37, 405 (1959)
- 9) K. Hilse u. G. Braunitzer, Z. Naturforsch., 14b, 603 (1959)
- 10) H.S. Rhinesmith, W.A. Schroeder u. N. Martin, J. Amer. chem. Soc. 80, 3358 (1958)
- 11) V.M. Ingram, Nature (London) 178, 792 (1956)
- 12) R.J. Hill, L.C. Craig, J. Amer. chem. Soc. 81, 2272 (1959)
- 13) W.H. Stein, G. Kunkel, R.D. Cole, D.H. Spackman u. S. Moore, Biochim. biophysica Acta 24, 640 (1957)
- 14) D.H. Spackman, W.H. Stein u. S. Moore, Analytic. Chem 30, 1190 (1958)
- 15) C.H.W. Hirs, J. biol. Chemistry 235, 625 (1960)
- 16) B. Liebold, G. Braunitzer, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 315, 271 (1959)
- 17) K. Hilse u. G. Braunitzer, Z. Naturforsch., 14b, 604 (1959)
- 18) R. Müller, Dissertation München im Druck
- 19) V. Rudloff, Dissertation München im Druck
- 20) B. Liebold, Dissertation München (1959)
- 21) J.R. Shelton u. W.A. Schroeder, J. Amer. chem. Soc. 82, 3342 (1960)
- 22) G. Braunitzer, N. Hilschmann, R. Müller, B. Liebold u. K. Hilse, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. im Druck
- 23) V.M. Ingram, Nature (London), 180, 326 (1957)
- 24) J.A. Hunt u. V.M. Ingram, Biochim. biophysica Acta 28, 546 (1958)
- 25) W.A. Schroeder, L. Zechmeister: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Band XVII, Seite 365
- 26) R.J. Hill u. W. Konigsberg, J. biol. Chemistry, 235, PC 21 (1960)
- 27) D.H. Simmonds, Australian J. biol. Sc., 8, 114 (1955)
- 28) J. Sjöquist, Ark. Kemi, 14, 291 (1959)
- 29) A.L. Levy, Nature (London) 174, 126 (1954)

Abkürzungsverzeichnis

Für die Aminosäurereste wurden in der vorliegenden Arbeit die von BRAND und EDSALL vorgeschlagenen Abkürzungen verwendet.

DCA :	Dichloressigsäure
BEW :	n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:5
Pyr. :	Pyridin
Coll.:	2, 4, 6-Trimethylpyridin
Ac. :	Acetat
DNP-:	2, 4- Dinitrophenyl-

Lebenslauf

In der schlesischen Stadt Waldenburg wurde ich als Sohn des Bergmannes Max Hilse und seiner Ehefrau Elisabeth Hilse, geb. Völkel am 12. 1. 1928 geboren. Von 1934 bis 1939 ging ich in Waldenburg zur Volksschule und wechselte dann in die städtische Oberrealschule über. Von 1940 bis 1944 besuchte ich die städtische Oberrealschule in Neurode Krs. Glatz und von 1947 bis 1950 dieselbige in Zittau/Sachsen. Dort legte ich im Juni 1950 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1952/53 immatrikulierte ich mich an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität in München und studierte dort Chemie. Am 4. November 1955 absolvierte ich die Diplom-Vorprüfung und am 27. September 1957 die Diplom-Hauptprüfung für Chemiker. Unter der Leitung von Herrn Professor Dr. A. Butenandt führte ich im Max-Planck-Institut für Biochemie in München die Diplom- und Doktorarbeit aus.

